

2^e Série

N^o d'ordre : 78

1933 - 1934

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY

pour obtenir le grade de Pharmacien Supérieur

(Section des Sciences Naturelles)

par Gustave QUIRIN

Licencié ès Sciences, Docteur en Pharmacie,

Chargé de Cours à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Reims

**Recherches sur la caractérisation du genre
Colibacille par la Réaction au Plomb.**

Soutenue le 26 Juillet 1934 devant la Commission d'examen

M. GRÉLOT, Président
M. SEYOT — M. GILLOT, Juges

1934.

1933 - 1934

THÈSE

présentée

A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE NANCY
pour obtenir le grade de Pharmacien Supérieur
(Section des Sciences Naturelles)

par Gustave QUIRIN

Licencié ès Sciences, Docteur en Pharmacie,

Chargé de Cours à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Reims

**Recherches sur la caractérisation du genre
Colibacille par la Réaction au Plomb.**

Soutenue le 26 Juillet 1934 devant la Commission d'examen

M. GRÉLOT, Président
M. SEYOT — M. GILLOT, Juges



UNIVERSITÉ DE NANCY - FACULTÉ DE PHARMACIE

PERSONNEL ENSEIGNANT

DOYEN HONORAIRE:

M. BRUNTZ, . Recteur de l'Université de Nancy

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. FAVREL.

BRUNTZ.

DOYEN :

M. SEYOT.

ASSESEUR:

M. GILLOT

PROFESSEURS:

MM. GRÉLOT,	Pharmacie galénique.
DOURIS,	Toxicologie
PASTUREAU	Pharmacie chimique
SEYOT,	Histoire naturelle
LASSEUR,	Microbiologie.
GILLOT,	Matière médicale.
PRÉVOST	Chimie organique.

AGRÉGÉ LIBRE :

M. GIRARDET	Chimie et Toxicologie
-----------------------	-----------------------

CHARGÉS DE COURS:

MM. PRÉVOST,	Chimie minérale et Minéralogie
GRÉLOT	Hydrologie.
PASTUREAU,	Chimie biologique
DONZELOT	Physique.
VERNIER	Zoologie.
SIMONNET,	Législation et Déontologie.
GILLOT,	Pharmacotechnie.
CORDEBARD,	Analyse chimique.
SEYOT,	Hygiène.

CHEFS DE TRAVAUX :

MM. VERNIER,	Microbiologie et Parasitologie.
MEUNIER,	Pharmacie.
CORDEBARD	Chimie et Analyse chimique.
STEIMETZ,	Micrographie.
DONZELOT(chargé de travaux)	Physique.
DIVOUX, (chargé de travaux)	Chimie biologique et Toxicologie.

SECRÉTARIAT:

M. E. TRIBOLET,	Secrétaire.
---------------------------	-------------

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ni les approuver ni les imputer.

Le Chapitre IV concerne l'Etude Chimique du milieu au plomb en fonction de l'élément Soufre.

Dans le Chapitre V, j'ai rendu compte des diverses expériences que j'ai tentées avec le milieu au plomb.

Enfin, dans le Chapitre VI, j'ai cherché par une interprétation des réactions obtenues, à donner une explication à la diversité des résultats auxquels on arrive, quand on ensemence le Colibacille sur le milieu classique au plomb.

Je remercie en particulier le Service des Souches de l'Institut Pasteur de Paris et le Docteur Téhoueyres, mon collègue à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Reims, qui ont mis à ma disposition les quelques espèces que j'ai pu étudier.

Ma reconnaissance va aussi à Monsieur le Professeur Lasneur de la Faculté de Pharmacie de Nancy, qui, m'ayant mis sur la voie de ce travail, m'a prodigué ses conseils éclairés.

Je ne saurais oublier l'intérêt que M. Marchal, Assistant de Microbiologie, a porté à mes recherches, et les services qu'il a eu l'amabilité de me rendre.

Mes remerciements vont également à Monsieur le Professeur Grélot, qui a bien voulu, avant de quitter sa chaire, accepter de présider le Jury chargé d'examiner mon travail.



CHAPITRE I

CARACTÈRES GÉNÉRAUX DU COLIBACILLE

ESCHERICH, qui isola ce germe pour la première fois en 1885 dans des selles de nouveau-né, montra que c'était un hôte normal de l'intestin.

LARUELLE en 1889 attire l'attention des chercheurs sur le rôle pathogène possible de ce micro-organisme.

Depuis, on a reconnu qu'il est très répandu chez l'homme et chez les animaux. On peut le rencontrer à l'état de simple saprophyte, mais comme l'avait fait remarquer LARUELLE, il peut devenir pathogène et c'est ce qui explique l'importance que l'on attache à sa recherche dans les Eaux de boisson.

DOPTER et SACQUEPEE (1914) le considèrent comme une « mauvaise espèce », c'est-à-dire comme une espèce bactériologique mal fixée et possédant des caractères assez variables.

Pour le déterminer avec certitude, on fait état d'abord de ses caractères morphologiques et de ses tendances à prendre telle ou telle matière colorante. D'autre part, on a réalisé des milieux de culture très divers, qui en assurant une certaine sélection, par la nature même de ces milieux, permettent à l'expérimentateur de fixer l'espèce et de la reconnaître avec certitude.

Pour PETRUSCHKI et PUCH (1903), le Colibacille se décolore toujours par la méthode de Gram : il fait fermenter certains sucres, tels que le glucose et le lactose, et peut se développer à des températures élevées.

KONRICH en 1910, qui s'est occupé surtout de la morphologie du Colibacille, a déclaré l'avoir obtenu soit sous forme de batonnet, soit sous forme de coccus.

Ces caractères se retrouvent chez tous les auteurs qui ont étudié ce germe, et GARTNER, en 1915, a parfaitement résumé l'état de la question dans son traité «l'Hygiène de l'eau», de la façon suivante :

« On entend actuellement par Coli typique, un batonnet court, gram négatif, asporulé, ne liquéfiant pas la gélatine même après 14 jours, faisant fermenter le glucose avec production d'acide et de gaz, coagulant le lait, transformant le rouge neutre en un colorant jaunâtre fluorescent et produisant de l'indol en solution peptonée».

VINCENT (1890), d'autre part, a pu obtenir des cultures très nettes à la température de 41° 5 C.

EIJKMANN (1904), a pu aller jusqu'à 45° C et obtenir, après ce passage, un germe qui peut encore faire fermenter le glucose, avec, toutefois, quelque ralentissement dans le phénomène de la croissance.

ROCHAIX, (1927), définit le Colibacille par les caractères suivants: C'est un Bacille à extrémités arrondies, plus ou moins mobile, aérobic facultatif, non sporulé, ne prenant pas le Gram, ne liquéfiant pas la gélatine, faisant fermenter les sucres, tels que : glucose, lactose, lévulose, maltose, galactose, donnant de l'indol et réduisant le Rouge neutre.

VIKULLIL, en 1927, insiste sur la mise en liberté d'hydrogène sulfuré en milieu peptoné et sur la réduction des nitrates en nitrites. La formation d'Indol et la réduction du Rouge neutre ne sont pour lui que réactions secondaires.

Dans l'ensemble, et sans insister davantage ici sur les caractères généraux du Colibacille, l'on admet la définition de GARTNER complétée par celle de ROCHAIX pour désigner d'une façon suffisante le genre Colibacille.

CHAPITRE II

RECHERCHE DU COLIBACILLE PAR LES MILIEUX DE CULTURE

Après examen des nombreux milieux de culture proposés pour l'ensemencement et le développement du Colibacille, il ne semble pas qu'on puisse conclure à l'existence de milieux essentiellement et uniquement sélectifs pour ce germe. Il végète abondamment sur la plupart des milieux usuels.

Sa différenciation est basée sur des caractères cultureux qui, pris isolément, ne lui sont pas absolument particuliers, mais dont l'ensemble permet, par l'emploi de méthodes spéciales, de l'isoler à partir d'une culture où il a été raréfié ou mêlé à des germes possédant une action différente.

Sa persistance dans certains milieux, sa résistance aux antiseptiques sont à la base de sa différenciation d'avec le Bacille d'Eberth, dont il possède par ailleurs beaucoup de caractères.

L'étude des divers milieux utilisés actuellement pour son isolement ou sa reconnaissance nécessite une division, toute arbitraire d'ailleurs, qui nous les fera classer en Milieux généraux et en Milieux particuliers.

(A) — MILIEUX GÉNÉRAUX

Bouillon et eau peptonée

A l'optimum de température et de pH, la culture est très rapide, visible vers la dixième ou douzième heure pour être abondante après vingt à vingt quatre heures. Le milieu est trouble et il existe une mince pellicule à la surface. On perçoit souvent une odeur fécaloïde plus ou moins accusée.

Gélatine

En pique, la culture est visible dès la 24ème heure à 20° C. elle devient ensuite abondante; le milieu n'est pas liquifié.

Sur plaques, les colonies d'abord translucides et bleutées, blanchissent et s'opacifient rapidement; le diamètre de la colonie peut atteindre 3 à 4 millimètres, les bords sont nets ou légèrement festonnés.

Gélose et Serum

Les colonies sont petites, blanches, crémeuses, à bords nets.

Lait

C'est en 1891 que MALVOZ constata que le lait était coagulé par le développement du Colibacille.

Le développement est abondant et la coagulation s'effectue en 24 ou 48 heures, à 37°C. Certains tubes ne sont pas toujours coagulés au bout de ce laps de temps, mais si on les chauffe légèrement, la coagulation s'effectue aussitôt.

On a préconisé le lait complet, puis le lait dégraissé, en raison de l'inconvénient résultant de la présence des matières grasses (HOLLANDE et GATE) (1916), puis le petit lait, auquel on ajoute de la teinture de Tournesol, qui par son virage au rouge, indique la mise en liberté de composés acides.

Pomme de Terre

Culture jaune au début; puis brunâtre et épaisse. La pomme de terre violette a été utilisée en 1905 par RODRIGUEZ comme milieu différentiel; le Colibacille fait virer au vert en 24 heures, tandis que le Bacille d'Eberth donne une teinte différente.

Artichaut

Il apparait au bout de 24 heures une coloration verte qui envahit toute la partie charnue, en même temps que se développe un enduit jaune et luisant.

Milieux Synthétiques

Le Colibacille ensemencé sur Milieux synthétiques se développe en général assez bien.

Les milieux contenant de l'urée, de l'asparagine, semblent les plus favorables.

Les milieux minéraux simples, tels que les solutions de NOEGELI, de FRANKEL, de REMY et VOGES suffisent souvent pour obtenir un beau développement.

Le liquide L I de LASSEUR, utilisé pour l'obtention de cultures de diverses Bactéries, convient également pour le Colibacille. La formule est la suivante :

Eau distillée	1000
Asparagine	9
Glycérine	25
Phosphate dipotassique	2.50
Sulfate de Magnésium	5
Chlorure de calcium	0.40
Sulfate ferreux	0.10

(B) — MILIEUX PARTICULIERS

Bouillons contenant des Hydrates de Carbone

La culture est particulièrement intense avec les bouillons qui contiennent soit du glucose, soit du lactose. On observe un abondant dégagement de gaz parmi lesquels on a reconnu la présence d'acide carbonique, d'azote et de méthane. Il y a en même temps mise en liberté dans le milieu de corps à fonction acide, parmi lesquels, l'acide lactique semble prédominer. L'addition de carbonate de chaux permet d'obtenir un rendement meilleur par fixation des acides. Le maximum de développement est atteint vers la 18ème heure à 37° C.

Le milieu de GRIZEZ ET PIERRET, qui est un bouillon

glucosé additionné de bile, convient parfaitement pour l'enrichissement des cultures de Colibacille.

Il semble que le milieu hydrocarboné le plus généralement utilisé est le bouillon à base de lactose.

CHANTEMESSE et VIDAL (1891) ont obtenu en bouillon lactosé, une fermentation abondante avec le Colibacille alors que le Bacille typhique s'est montré sans action.

Pour mettre en évidence la formation d'acides, WURTZ (1891), prépare un milieu solide à base de gélose lactosée, et auquel il ajoute un peu de teinture de Tournesol qui par son virage au rouge indique la présence des acides. Les colonies de Colibacille sont, de ce fait, colorées en rouge.

L'attaque de la substance hydrocarbonée par le Colibacille conduisant à la mise en liberté dans le milieu, de corps à fonction acide et en majeure partie d'acide lactique, il était normal que l'on eut l'idée d'ajouter au milieu, un réactif indicateur des acides. Le tournesol convient très bien et donne d'excellents résultats. Aussi, la gélose lactosée tournesolée constitue dans la plupart des laboratoires de Bactériologie un des milieux employés journellement pour la recherche du Colibacille. Il suffit de trois gouttes de Teinture de Tournesol sensibilisée pour 10 centimètres cubes de milieu. On la conserve en ampoules scellées préalablement tyndalisées.

Le milieu d'ENDO (1904) est encore basé sur la formation d'acides par décomposition de la molécule du Lactose. Il se prépare en ajoutant à la gélose lactosée une petite quantité de Fuchsine qu'on décolore par du bisulfite de soude.

Le milieu ainsi décoloré est ensuiteensemencé.

Les colonies de Colibacille apparaissent en rouge, par suite de la réaction des acides sur la combinaison incolore Fuchsine-bi-

sulfitée. Le Bacille d'Eberth, qui n'attaque pas le Lactose, peut ainsi être séparé du Colibacille.

Une modification intéressante et qui permet de rendre la méthode beaucoup plus sensible, a été apportée à ce milieu par

MARCHAL (1) :

La gélose - peptone de formule ordinaire (peptone : 20 grammes; gélose: 3 grammes pour 1000 cm³ d'eau) est ajustée à pH : 7,6, collée au blanc d'œuf, puis précipitée trois-quarts d'heure à l'autoclave à 120° C, et filtrée sur papier CHARDIN.

On prépare de même extemporanément les solutions suivantes :

1° - Solution alcoolique de fuchsine basique :

0 gr. 20 de fuchsine basique,

10 cm³ d'alcool à 95°

2° - Solution aqueuse de sulfite de soude au 1/10°.

3° - Solution de lactose au 1/10°, dans l'eau distillée.

Mode Opératoire

A 300 cm³ de gélose peptone, amenée à la fusion au bain-marie, on ajoute :

1° - 3 cm³ de solution alcoolique de fuchsine;

2° - 30 cm³ de solution de lactose au dixième;

3° - après agitation, on porte le tout vers 90-95° C.

Dès que cette température est atteinte, on verse la solution aqueuse de sulfite neutre, à l'aide d'une burette, jusqu'à ce qu'une petite portion de gélose, placée dans un tube à essai et refroidie sous un courant d'eau, ne présente plus de coloration rose (2).

(1) MARCHAL - Contribution à l'Etude de la Variation en Microbiologie. Thèse doctorat ès Sciences - Nancy 1932.

(2) La gélose d'Endo incolore à la température ordinaire se recolore légèrement sous l'action de la chaleur, lorsqu'on fait fondre le milieu. Cette teinte disparaît au moment de la reprise en masse du milieu.

Le milieu ainsi préparé est réparti en tubes de 10 à 15 cm³. Ceux-ci, bien bouchés à la ouate, sont tyndalisés en les portant 3 jours de suite à 100° C, pendant trois-quarts d'heure.

Le milieu doit être conservé à l'obscurité complète. Malgré une légère teinte rose (1) apparaissant au bout d'un certain temps, on a encore un excellent substratum virant facilement.

La gélose d'ENDO, en boîte de PETRI, doit être utilisée sous une épaisseur assez faible, car elle paraît se teinter beaucoup moins par séjour assez prolongé à l'étuve, que lorsqu'elle se trouve en épaisseur assez grande.

Le milieu d'ENDO modifié, comme il vient d'être indiqué, permet le diagnostic en 16 heures, au maximum, des germes fermentant le lactose. Au bout de 10 heures de séjour à l'étuve à 37° C, le Colibacille donne sur cette gélose une colonie complètement rouge, qui au bout de 24 heures prend un aspect métallique, vue sous une certaine inclinaison. Cette colonie est, de plus, entourée d'une zone annulaire colorée de façon intense.

Le milieu de GONZALES est constitué par une gélose-peptone ordinaire amenée à pH : 7,2, puis précipitée, à laquelle on ajoute une solution aqueuse de bleu de méthyle décolorée (par 10 cm³ de Na OH normale, à l'ébullition), dans la proportion de 1 cm³ pour 100 cm³ de gélose.

On ajoute ensuite une solution de lactose pour obtenir un milieu sucré à 1 p. 100. Le pH étant ramené à 7,4 par addition de HCL N/10, on répartit en tubes et tyndalise à 100° C une demi-heure, 3 jours consécutifs. Ce milieu coulé en boîte de PETRI avec une émulsion bactérienne, suivant la technique d'isolement

(1) On sait que l'oxygène de l'air de même que la lumière, agissant sur des milieux sucrés, ont la propriété de les acidifier légèrement et de provoquer un virage spontané des indicateurs colorés, tels que le tournesol et la fuchine bisulfitee.

de KOCH, permet d'obtenir des colonies bleues, sur fond à peu près incolore, avec le Colibacille.

Le milieu de DRIGALSKI-CONRADI consiste à préparer trois solutions :

a) Faire macérer pendant vingt-quatre heures 1500 gr. de viande dans 2 litres d'eau, puis exprimer, faire bouillir une heure; ajouter 20 grammes de peptone de **Witte**, 20 grammes de nutrose et 10 grammes de sel marin; faire bouillir une heure; ajouter 60 grammes de gélose, porter une heure à l'autoclave, dans un ballon.

On peut remplacer la macération de viande par 20 grammes d'extrait Liebig.

b) Dissoudre 30 grammes de lactose dans 300 centimètres cubes de teinture de tournesol; faire bouillir quinze minutes.

c) Stériliser une solution de soude à 10 p. 100

d) Dissoudre 0 gr 10 de kristall-violet (marque Höchst) dans 100 centimètres cubes d'eau distillée chaude.

La solution (a) encore chaude et liquide, y verser la solution lactose-tournesol; puis agiter pour faire mousse et incliner pour porter la mousse dans le col; ajouter de la soude jusqu'à ce que la mousse soit légèrement bleue. A ce moment, ajouter encore 4 centimètres cubes de soude à 10 p. 100. Verser enfin 20 centimètres cubes de la solution de kristall-violet. Répartir en flacons ou en boîtes de Petri.

Le Bacille d'Eberth et les Bacilles paratyphiques donnent des colonies incolores. Les colonies du Bacille coli sont rouges.

Le milieu de CHANDELIER (1) est constitué par un bouillon gélosé à 30 grammes par litre contenant 15 g. de lactose auquel on ajoute après stérilisation une solution aqueuse stérile

(1) GALLI-VALERIO : Centralblatt f. Bakt. II. T. 45 p. 135.

de Rouge congo dans la proportion de 10 centimètres cubes pour 100 de Milieu.

Le Colibacille donne sur ce Milieu des colonies d'un bleu-noir, alors que le Bacille typhique donne des colonies rouge-foncé.

Milieus à base d'antiseptiques.

On sait que d'une façon générale, la vitalité des Bactéries est défavorablement influencée par une foule de substances chimiques dites antiseptiques. La dose d'antiseptiques varie dans de larges limites suivant que l'on désire simplement arrêter ou ralentir le développement d'un germe déterminé, ou bien que l'on cherche à le détruire. Elle varie aussi suivant les milieux employés et suivant la température.

A ce sujet, S. LAMBIN (1) a parfaitement mis en valeur l'influence exercée sur l'activité germicide par les propriétés de la substance désinfectante. Dans cette action il faut faire entrer en ligne de compte, la qualité et la quantité des germes en expérience, le milieu de suspension des germes, la nature du milieu intermédiaire de l'essai, la température, le temps d'action du désinfectant et les propriétés antigénétiques de la substance étudiée.

L'auteur a fixé pour 3 antiseptiques pris comme type, le Bichlorure de Mercure, le Phénol, l'Iode, une technique particulière pour la détermination de la mesure de la valeur antibiotique des antiseptiques sur les germes.

Les sels biliaires tauro-cholate et glycocholate de soude, la bile elle-même ont été ajoutés à certains milieux dans le but d'arrêter le développement de certains germes, tout en favorisant les cultures de Colibacille.

(1) S. LAMBIN - Méthode de Mesure de l'activité antimicrobienne des substances chimiques — Thèse de Doctorat ès Sciences — Paris 1933.

(MAC CONKEY - 1900 - RITTER 1919)

(GRISEZ ET PIERRET 1920)

On a utilisé dans le même but, c'est-à-dire pour isoler le Colibacille d'avec d'autres germes, des composés tels que l'acide arsénieux, la caféine seule et additionnée de cristal violet.

L'acide phénique à la dose de 1 g. par litre de bouillon et à la température de 40 à 41° C. passe pour un moyen excellent d'isolement pour la recherche du Colibacille dans l'eau et dans les liquides physiologiques.

Milieux bases sur le pouvoir réducteur du Colibacille

Action Denitrifiante

L. HUGOUNENCQ et M. DOYON (1897) (1) ont montré que le Colibacille ensemencé dans une dilution de bouillon de viande contenant du nitrate de potassium à 1 pour 100, à la température de 35° C, attaque le nitrate et dégage de l'Azote. Le Bacille d'Eberth ensemencé dans les mêmes conditions donne le même dégagement gazeux.

Le nitrate de sodium est décomposé de la même façon que le nitrate de potassium.

L. GRIMBERT (1903) (2) a fait remarquer que la nature du milieu joue un rôle considérable - Quand on ensemence le Colibacille dans une solution de peptone à 1 pour 100 contenant également 1 gramme de nitrate de potassium pour 100, on n'obtient pas de dégagement gazeux; une faible proportion du nitrate est transformé en nitrite que l'on reconnaît facilement par

(1) L. HUGOUNENCQ & M. DOYON — Sur une nouvelle fonction chimique commune au Colibacille et au Bacille d'Eberth C. R. Société de Biologie 1897 — p. 198.

(2) L. GRIMBERT - Diagnostic des Bactéries par leurs fonctions biochimiques - 1903. Thèse Doctorat en Médecine. — Paris.

l'analyse. Si on ajoute de l'extrait de viande ou du bouillon ordinaire, on observe un dégagement de gaz abondant.

La différence d'après GRIMBERT, provient de la présence de substances amidées sur lesquelles agit l'acide nitreux résultant de la réduction du nitrate par la Bactérie; le volume du gaz obtenu est au moins double de celui qui correspond au poids de l'azotate détruit.

Par contre, un autre germe, le Bacille pyocyanique décompose les nitrates sans le secours de matériaux amidés et le volume d'azote correspond au poids du nitrate détruit, en solution peptonée simple.

GRIMBERT a dévisé les germes qui attaquent les nitrates de la façon suivante :

Ferments dénitrifiants vrais. Exemple: Bacille pyocyanique.

Ferments dénitrifiants indirects. Exemple: Colibacille.

Le Colibacille décompose les nitrates, mais à condition de trouver, dans le milieu, des complexes amidés.

Milieux au rouge neutre

Après avoir remarqué que les différents éléments colibacillaires n'ont pas tous la même vitalité et que, d'autre part à propos d'analyses d'eau, par exemple, certains germes affaiblis sous une influence quelconque peuvent très bien être incapables de se multiplier dans certains milieux, il parut utile de rechercher le Colibacille par une autre réaction.

Le Rouge neutre est le Chlorhydrate de diméthyl-diamido-toluphénazine asymétrique qui, sous l'action des alcalis, perd sa coloration rouge pour donner une teinte jaune. Le mélange traité par l'acool ou l'éther est doué d'une fluorescence verte.

On prépare un bouillon peptoné auquel on ajoute 5 g. de

glucose par litre. On met 0.50 de Rouge neutre pour un litre de bouillon.

La stérilisation se fait à 115° pendant 30 minutes (W. S. SAVAGE 1901).

On obtient ainsi un bouillon nettement coloré en rouge. - Après ensemencement par une culture de Colibacille, il se développe au bout de 24 heures une belle fluorescence verte et la coloration rouge du début disparaît. Le milieu est régulièrement jaune canari.

On a conseillé également des milieux solides à la gélose avec Rouge neutre et qui conduisent au même résultat.

ROCHAIX et DUFOUR en 1911, ont montré que les Urobactéries, quand elles sont récemment isolées; donnent toujours le virage jaune avec fluorescence verte; mais le virage du milieu et la production du gaz n'existent que dans les cas où le Colibacille est présent.

Il faut toujours considérer les deux éléments :

- 1) la coloration jaune canari par transparence,
- 2) la fluorescence verte par réflexion.

Seuls, les microbes de la fermentation ammoniacale, et en particulier, le Colibacille donnent les deux éléments de la réaction.



Milieux Métalliques.

On a réalisé des expériences en faisant agir le Colibacille sur des milieux contenant du Fer. Le fer est libéré de ses combinaisons et agit ensuite sur les réactifs ordinaires.

Léon MULLER (1922) (1) a constaté le fait suivant :

Certains composés du fer contiennent le métal à l'état dissimulé et les réactifs classiques ne donnent pas avec eux les réactions caractéristiques. C'est le cas, entre autres, pour le malate de fer, l'iodure de fer lactosé, le saccharate de fer, etc., mais sous l'action de certains facteurs, l'ion métallique peut être libéré et donne alors les réactions classiques du fer. L'auteur a utilisé plusieurs formules; parmi celles qui lui ont donné les résultats les meilleurs, on peut citer la composition suivante :

Bouillon ordinaire alcalinisé à 10 pour

1.000 de soude normale	1000 gr.
Lactose pur	25 gr.
Extrait de fer pommé dilué au 1/10° ...	30 cc
Ferrocyanure de potassium au 1/10° ...	30 cc

Sur ce milieu, le Colibacille donne un liquide trouble, à reflet bleuâtre et un dépôt bleu foncé.

Si on emploie la gélose alcalinisée à 10 pour 1.000, au lieu de bouillon, dans le milieu ci-dessus, on obtient un milieu sur lequel le Colibacille produit une coloration verte, tandis que le Bacille typhique donne un voile blanchâtre. Grâce à ces milieux de culture, l'auteur a pu déceler le Colibacille dans des cas où d'autres procédés de culture avaient échoué.

Un autre milieu proposé est basé sur l'action exercée sur un

(1) L. MULLER - Un nouveau procédé de différenciation des microbes des types coli et typhique - C. R. Soc. de Biologie - t. LXXXVII-1922 p. 984 et 1251.

sel de plomb; il suffit d'ajouter un peu de sous acétate de plomb au milieu gélosé ordinaire et d'y faire cultiver le Colibacille. On obtient, une coloration noire par formation de sulfure de plomb. Il s'agit ici d'une action de réduction par mise en liberté d'hydrogène sulfuré et action de ce composé sur le sel de plomb introduit dans le milieu.

C'est l'étude détaillée de cette dernière réaction que j'ai eue en vue dans les recherches dont je donnerai plus loin les résultats.



· CHAPITRE III

CONSIDÉRATIONS GÉNÉRALES SUR LES MILIEUX EMPLOYÉS POUR LA RECHERCHE DU COLIBACILLE.

A la page 7 et avant de passer en revue les principaux milieux préconisés pour la recherche du Colibacille, j'ai tenu à signaler que les méthodes employées, chacune étant prise à part, ne pouvaient pas être considérées à priori comme des méthodes de sélection et d'isolement de ce germe.

Il faut ajouter, quant aux conclusions à tirer de l'emploi des milieux considérés pour la recherche du Colibacille, que les opinions des différents expérimentateurs ne sont pas toujours en concordance absolue.

C'est ainsi que VIKULLIL n'attache qu'une importance secondaire à la formation d'Indol et à la réduction du Rouge neutre.

D'après Mac CONKEY, la plupart des Colibacilles d'origine humaine ne fait pas fermenter le saccharose alors que la plupart des Colibacilles d'origine animale le fait fermenter.

GERNEZ ET DUTHOIT (1923) considèrent comme Colibacille certains germes ne produisant pas d'Indol, mais possédant par ailleurs d'autres caractères du groupe.

GROETSCHHELL (1924) constate la présence d'un grand nombre de Colibacilles dans une eau, et cependant n'obtient pas la fermentation du glucose à 46° C. Il ajoute, qu'il s'agit d'une eau riche en nitrates, et met sur le compte de cette grande proportion de nitrates l'absence de réaction sur le glucose.

YUNGEBLUTT en 1922, fait remarquer que certains Coli-

bacilles ne produisent pas de gaz dans le milieu de BULIR à la mannite.

De même, ROCHAIX en 1923, signale après des expériences effectuées sur milieux gélosés, avec esculine, que ce milieu ne permet pas d'obtenir avec le Colibacille une réaction suffisamment constante pour constituer un caractère biochimique de réelle valeur.

On a discuté beaucoup, également, la méthode qui utilise les milieux au plomb; certains auteurs obtiennent une réaction positive, d'autres, et il semble que c'est la généralité, prétendent que cette méthode n'est pas fidèle et ne donne pas de résultats concordants.

On a voulu expliquer cette non-concordance des réactions par le fait, que le micro-organisme très répandu dans la nature peut vivre dans des milieux extrêmement différents. Il s'en suit que, par la diversité de ses habitats, il acquiert peu à peu des caractères nouveaux en fonction de son origine et des milieux dans lesquels il s'est développé; ce qui fait que certaines souches agissent plus ou moins fortement sur les réactifs et d'autres au contraire ont une action nettement négative.

Ce sont, d'ailleurs, à un point de vue plus général, des constatations qui ont été observées depuis bien longtemps; En 1883. ROUX publiait avec CHAMBERLAND, dans les Comptes rendus de l'Académie des Sciences (1) une note dans laquelle ils signalaient l'existence de Bactéridies charbonneuses qui avaient perdu d'une façon définitive, la faculté de donner des spores.

Ils obtenaient cette race de Bactéridies en cultivant du sang charbonneux dans du bouillon additionné d'une trace de Bichromate de potasse. Dans les cultures faites en présence de cet antiseptique, il y avait diminution de virulence.

(1) C. R. - Académie des Sciences 1883 — p. 1410

Reprenant en 1890 cette étude des Bactérides charbonneuses asporogènes, ROUX revenait sur une idée chère à PASTEUR.

« Il n'est pas téméraire de penser, écrivait-il, que, dans la nature «des conditions puissent être réalisées qui transforment, à notre insu, des Bactéries ordinaires en Bacilles atténués et asporogènes Les dissemblances entre des Microbes de même origine tiennent sans doute aux vicissitudes diverses qu'ils ont éprouvées et aux incidents d'un passé que nous ne connaissons pas». (1).

Les auteurs sont nombreux qui ont étudié les transformations subies par diverses espèces bactériennes au cours d'ensemencements sur les milieux différents, et qui ont observé les modifications apportées aux caractères réactionnels des espèces envisagées (2).

En ce qui concerne le Colibacille, GEORGHIOU ET BARTII (3) ont étudié un certain nombre de souches au point de vue de la fermentation des sucres et surtout des propriétés antigéniques. — Sur 18 souches étudiées, quatre étaient d'origine animale. Ces dernières ont montré, en général, vis à vis des milieux sucrés et des agglutinines, une action nettement différente de celle obtenue avec les autres.

KLIENENBERGER (4) décrit une souche particulière de Colibacille qui donne les variétés les plus différentes au cours de 2 ans.

(1) PASTEUR VALLERY-RADOT — Deux figures de savants — Monsieur Roux, — Revue des Deux Mondes — 15 décembre 1933.

(2) MARCHAL — Variations et mutations en Bactériologie, 1932; chez Le François - Paris.

(3) GEORGHIOU et LARTH — Propriétés biochimiques et sérologiques des différentes souches de Colibacille C. R. Soc. de Biologie, t. 98, 1er juin 1928 p. 1631.

(4) KLIENENBERGER — Formation de formes atypiques sous l'influence du bactériophage — Zentralblatt für Bakteriologie — t. 112 19 juin 1929 p. 354.

Il a pu distinguer les variétés suivantes :

Souche Colibacille, formant mucus, avec gaz,

Souche Colibacille, formant mucus, sans gaz,

Souche Paracolibacille,

Souche Paratyphoïde,

Souche Typhoïde.

La plupart de ces variétés sont largement constantes. Elles montrent de grandes différences dans leurs réactions sérologiques, et leur sensibilité bactériophage.

Certaines Souches filles paraissent largement influencées par l'addition d'un Bactériophage, alors que les autres paraissent résister énergiquement.

BOYER ET BOIRON (1) qui ont étudié l'action des hypochlorites sur certaines Souches, ont constaté des effets différents en rapport avec la durée du séjour dans l'eau renfermant divers produits tels que glucose, urée, peptone, etc.... Il y a également production de nouvelles Souches dont la résistance aux réactifs se modifie .

BESSON et EHRINGER (2) ont décrit 9 races de Colibacilles dont certaines ne produisent pas d'Indol. — Ils les divisent en 3 types qu'ils classent de la façon suivante :

1° Race A n'attaquant ni la saccharose ni la dulcité, comportant 3 types.

a) produisant de l'Indol et de l'Hydrogène sulfuré

(1) BOYER & BOIRON - Variation avec la durée de son séjour dans l'eau de la sensibilité du Colibacille aux hypochlorites - Cptes rendus Sté. de Biologie, t. 108 1er déc. 1931 p. 982.

(2) BESSON & EHRINGER - Infections intestinales et Colibacille Rev. Méd. 1924 p. 345 & 419.

- b) produisant de l'Indol sans Hydrogène sulfuré
- c) ne produisant ni Indol ni Hydrogène sulfuré.

2° Race B attaquant le saccharose mais pas la dulcité, comportant 2 types -

- a) Produisant de l'Indol et de l'Hydrogène sulfuré,
- b) ne produisant ni Indol ni Hydrogène sulfuré

3° Race C attaquant le saccharose et la dulcité, produisant de l'Indol et de l'Hydrogène sulfuré.

On a prétendu, d'autre part, que le Colibacille ne produit pas d'Hydrogène sulfuré et qu'il ne noircit par les milieux au plomb. Pourtant, alors que certaines races ne manifestent, en effet aucune réaction sur les milieux au plomb, d'autres, au contraire, noircissent nettement les mêmes milieux.

MORRIS ET ORLOWSKY (1) ont constaté facilement le dégagement d'Hydrogène sulfuré et sa formation régulière dans les milieuxensemencés avec certaines races.

VIKULLIL a signalé également l'existence de l'hydrogène sulfuré dans les cultures en bouillon peptoné, et il en fait un caractère important du genre Colibacille.

On reconnaît à ce germe des propriétés réductrices; c'est ainsi que l'on explique son action sur les nitrates et sur les nitrites.

Quant aux milieux renfermant des sels de plomb, il y aurait d'abord dissociation des molécules soufrées contenues dans le milieu, formation d'hydrogène sulfuré, puis de sulfure de plomb par l'action ultérieure ou simultanée de l'hydrogène sulfuré, mis en liberté, sur le dérivé plombique introduit dans le milieu.

(1) MORRIS - Arch. für Hygiene 1 XXX - 1897 p. 304.
ORLOWSKY - Centralblatt für Bakt. XXII - 1897 - p. 134.

B. S. MATTAR (1) n'a pas pu mettre en évidence la présence d'hydrogène sulfuré sur 8 Souches étudiées.

Or, dans toute réaction bactériologique, il faut non seulement envisager les qualités de l'organisme mis en expérience, mais aussi la composition du milieu dans lequel il doit évoluer.

GUIGNARD ET CHARRIN (1887) en cultivant le *Bacillus pyocyaneus* dans des milieux contenant du Bichromate de potasse, du thymol, de l'alcool, de l'acide borique, ont obtenu des modifications très importantes dans la morphologie des Bactéries.

WASSERZUG, en 1888, a signalé également l'existence de variations morphologiques importantes provoquées chez les Bactéries par des agents extérieurs.

PEJU ET RAJAT (1906), en introduisant certains sels dans les milieux de culture ont obtenu un allongement caractéristique des plastides bactériennes.

LASSEUR a fait remarquer en 1911, l'influence très nette des corps à fonction basique sur l'allongement, et d'autre part des corps à fonction acide sur le raccourcissement des cellules de *B. chlororaphis* (Guignard et Sauvageau).

Sur le milieu L 1 (2) normal, ce germe présente un aspect filamenteux bien caractérisé.

LASSEUR a remarqué également que sous l'influence des antiseptiques, on peut noter des zones de concentration dans lesquelles on peut assister à des modifications biologiques;

Ces zones précèdent celles où on constate la suppression de la vie bactérienne, et on peut conclure avec lui que : « La morphologie externe des Bactéries ne saurait à elle seule permettre un

(1) B. S. MATTAR - Contribution à l'Etude du Colibacille dans. les Eaux de boisson - Thèse Dr. en Phie Faculté de Phie de Nancy 1930.

(2) - Le milieu L I de LASSEUR est le milieu synthétique proposé pour cultiver les germes chromogènes et dont la formule a été donnée
page : 11.

diagnostic rigoureux. Elle est fonction de trop nombreux facteurs. »

Ces variations dans la morphologie s'accompagnent généralement de variations biologiques et c'est en évoquant les résultats de ces divers travaux qu'à propos de la réaction spéciale du Colibacille sur les sels de plomb, j'ai envisagé d'étudier l'importance que pourrait avoir l'élément Soufre sur le résultat final du phénomène.

Il est certain que l'on est mal fixé au sujet de savoir si dans tous les milieux au plomb utilisés par les différents laboratoires, pour la recherche et l'identification du Colibacille, il existe du Soufre en plus ou moins grande quantité. On peut se demander, alors si les résultats négatifs obtenus dans certains cas, ne tiennent pas précisément, soit à l'absence totale, soit à la présence d'une quantité trop faible de l'élément Soufre, dans les milieux considérés.

Une autre question qui se pose, serait de pouvoir connaître la nature chimique des combinaisons dans lesquelles se trouve engagé le métalloïde, combinaisons plus ou moins complexes, dont la dissociation rapide ou lente effectuée par le Colibacille, peut aboutir ou non, à la formation du Sulfure de plomb. On peut se demander aussi, si la présence d'éléments en voie de dissociation acides ou basiques, mis en liberté dans le milieu de culture, par l'action du Colibacille, n'est pas un obstacle à l'apparition de l'Hydrogène sulfuré.

Il m'a paru intéressant d'étudier en détail la Réaction en question, en ajoutant à des milieux identiques des éléments chimiques renfermant du Soufre, sous différents états d'oxydation.

J'ai été conduit à étudier dans ces milieux le développement de plusieurs Colibacilles, différents par leur origine, ainsi qu'un Paratyphique A et un Paratyphique B.

CHAPITRE IV

ÉTUDE DU MILIEU

J'ai divisé ce Chapitre en deux parties :

Dans la première, après avoir donné le mode de préparation du milieu de culture employé dans mes recherches, j'ai cherché à connaître la quantité de Soufre qu'il peut renfermer.

Dans la 2ème partie, le dosage du Soufre total a été effectué sur un bouillon non ensemencé pris comme témoin, puis sur le même bouillon après mise en culture et développement du Colibacille.

1ère PARTIE

La formule du milieu au plomb généralement adoptée est la suivante :

Viande de bœuf dégraissée et hachée	500 grs
Peptone	10 grs
Chlorure de Sodium	5 grs
Gélose	20 grs
Eau	1 litre

La viande est mise à macérer dans l'eau pendant 12 heures à la température ambiante, puis portée à l'ébullition 10 minutes. On filtre sur papier mouillé, et dans le liquide filtré, on ajoute la peptone, le chlorure de sodium et la gélose préalablement préparée.

Quand tout est dissout, on neutralise avec la soude diluée afin d'arriver à un pH. : 7.

On chauffe ensuite à 110° pendant un quart d'heure pour

précipiter les phosphates alcalino-terreux - On filtre de nouveau, et on répartit en mesurant 10 cc par tube, de façon à obtenir des tubes contenant tous la même quantité de liquide. Ces tubes sont ensuite bouchés au coton et stérilisés à 105° pendant vingt minutes.

Etant donnée l'importance qu'il m'a semblé devoir attribuer à l'élément Soufre ou à ses composés, j'ai tenu à préparer 2 séries de milieux différents par la qualité de l'eau employée, les uns sont à base d'eau distillée, les autres à base de l'eau des fontaines de Reims, c'est-à-dire de la concession de la Ville.

Afin de réaliser des milieux qui puissent être exactement comparables entre eux, la viande servant de base à ces préparations a été partagée en 2 parties égales, l'une a servi à faire le bouillon avec de l'eau distillée, et l'autre a été mise à macérer avec l'eau de fontaine.

On obtient ainsi 2 séries de milieux qui ne diffèrent que par l'eau utilisée.

Le dosage du Soufre a été effectué sur ces 2 séries de bouillon (1)

1. DOSAGE DU SOUFRE MINÉRAL

Le Soufre minéral contenu dans le milieu est représenté par une petite quantité de sulfates alcalins et calcique, forme minérale précipitable par le chlorure de baryum en milieu acide, suivant la réaction générale, bien connue.

Le dosage s'effectue par la Méthode habituelle en traitant un volume déterminé du bouillon, acidifié par l'acide chlorhydrique, par un petit excès de chlorure de baryum.

(1) Ces analyses ont été effectuées sur le bouillon sans gélose.

Le mélange est porté à l'ébullition, le dépôt est recueilli sur un filtre, puis lavé, séché, calciné et pesé suivant la méthode classique. On évalue en Soufre.

J'ai préféré cette méthode au Sulfate de baryum à celle à la Benzidine en raison de sa simplicité et de la commodité de sa mise en œuvre.

2. DOSAGE DU SOUFRE NON MINÉRAL

Le soufre non précipitable directement par le chlorure de baryum est fixé dans des combinaisons organiques (1) qu'il faut naturellement dissocier pour l'amener à un état susceptible de subir ultérieurement l'action du réactif précipitant.

Les méthodes de dissociation de la molécule organique renfermant l'élément minéral se ramènent presque toujours dans ce cas, à une oxydation énergique qui aboutit à la solubilisation de l'agent recherché, que l'on retrouve ensuite sous une forme facile à isoler.

ABDERHALDEN et FUNCK (2) ont mis au point le procédé de FOLIN qui consiste à oxyder les complexes sulfurés par le Bioxyde de Sodium et chauffer ensuite au rouge. Après refroidissement, on reprend par l'Acide chlorhydrique dilué qui dissout le Soufre à l'état de sulfate.

GILL ET GRINDLEY (3) qui ont employé cette méthode pour doser le Soufre total de l'urine, ont constaté une perte par dégagement d'Hydrogène sulfuré, quand on fait agir l'acide chlor-

(1) M. LABBE-H. LABBE, F. NEPVEU. Techniques de Laboratoire appliquées aux maladies de l'appareil digestif-Métabolisme du Soufre p. 325

(2) ABERHALDEN ET FUNCK - Dosage du Soufre dans l'urine - Zeitschrift für Phys. Chemie. 58 p. 331.

(3) GILL et GRINDLEY - Détermination du Soufre total dans l'urine Ann. Chem. Soc. 31, p. 52 et Bulletin Soc. Chimique 1910, p. 57.

hydrique sur la masse fondue - Ces auteurs préfèrent procéder à l'oxydation de la matière organique, par l'acide azotique fumant.

A. LESURE et A. THOMAS (1) ont obtenu d'excellents résultats par l'emploi de l'acide azotique et du perhydrol.

C'est la technique que j'ai utilisée, en opérant sur 200 centimètres cubes de bouillon, que l'on évapore à consistance sirupeuse. On ajoute quelques centimètres cubes d'acide azotique fumant exempt de Soufre - On chauffe doucement à feu nu sous la hotte et dès que le dégagement de vapeurs nitreuses est terminé, on ajoute goutte à goutte 2 à 3 centimètres cubes de perhydrol pur, exempt de Soufre. On continue à chauffer légèrement, jusqu'à ce que l'on obtienne un liquide incolore, que l'on évapore à sec au bain-marie.

On reprend ensuite par quelques centimètres cubes d'acide chlorhydrique dilué et on ajoute le chlorure de baryum comme précédemment. Un nouveau dosage à l'état de Sulfate de baryum donne le chiffre du Soufre total comprenant le Soufre minéral soluble et le Soufre organique.

Par différence entre le chiffre du Soufre total et celui du Soufre minéral, on obtient celui du Soufre organique.

Le tout est évalué en Soufre pour 100 centimètres cubes de bouillon.

Les résultats obtenus sont consignés ci- dessous :

RÉSULTATS

Bouillon préparé à l'eau distillée			
	S. Total	S. Minéral	S. Organique
N° 1	0 gr. 0360	0 gr. 0190	0 gr. 0170

(1) A. LESURE et A. THOMAS - Dosage du soufre sanguin et du soufre urinaire. Journal de Pharmacie et de Chimie. 1er Fév. 1933, t. XVII - No 3 p. 114.

N ^o 2	0 gr. 0480	0 gr. 0240	0 gr. 0240
N ^o 3	0 gr. 0116	0 gr. 0061	0 gr. 0055
N ^o 4	0 gr. 0096	0 gr. 0073	0 gr. 0023
N ^o 5	0 gr. 0105	0 gr. 00450	0 gr. 00600
N ^o 6	0 gr. 01130	0 gr. 00480	0 gr. 00650

Bouillon préparé à l'eau de fontaine

N ^o 1	0 gr. 0370	0 gr. 0198	0 gr. 0172
N ^o 2	0 gr. 0488	0 gr. 0248	0 gr. 0240
N ^o 3	0 gr. 0123	0 gr. 0070	0 gr. 0053
N ^o 4	0 gr. 0106	0 gr. 0082	0 gr. 0024
N ^o 5	0 gr. 01100	0 gr. 0050	0 gr. 00600
N ^o 6	0 gr. 0120	0 gr. 0055	0 gr. 0065

Il résulte de ce tableau que la présence du Soufre est nettement démontrée dans les milieux employés pour la réaction au plomb.

En second lieu, on y trouve le Soufre sous 2 états chimiques bien différents : Soufre minéral décelable par le chlorure de Baryum et Soufre organique provenant de la chair musculaire utilisée dans la préparation - (Soufre organique non décelable directement par le Chlorure de Baryum).

D'autre part, les quantités respectives de chacun de ces 2 éléments varient dans des limites relativement considérables, suivant les échantillons de bouillon auxquels on s'adresse. Ces différences proviennent naturellement de la chair utilisée dans la préparation.

Enfin, l'analyse montre comme on pouvait le prévoir, que l'addition d'Eau de fontaine apporte dans les milieux une certaine quantité de Soufre minéral, qui n'est pas négligeable, en sorte que les milieux à l'Eau de fontaine renferment toujours une quantité de Soufre total plus élevée que les milieux à l'Eau distillée.

Il ne faut pas s'en étonner. Le dosage du Soufre dans l'eau de Reims m'a donné comme chiffre moyen, la quantité de 8 à 10 milligrammes par litre. Les chiffres obtenus dans les analyses des bouillons, indiqués précédemment concordent bien avec cette donnée.

DEUXIÈME PARTIE

Pour compléter ces résultats, il me parut intéressant de rechercher quelle pouvait être l'action du développement du Coli-bacille sur le taux du Soufre lui-même contenu dans le milieu.

En d'autres termes, connaissant la quantité de Soufre total contenu dans le bouillon par un premier dosage, il y avait lieu de l'ensemencer avec une race noircissant nettement le milieu, auquel on a soin d'ajouter quelques centimètres cubes de sous-acétate de plomb avec les précautions d'usage.

Après quelques jours de culture et après agitation du ballon pour obtenir un liquide parfaitement homogène, on effectue un nouveau dosage du Soufre total.

La méthode employée dans ce cas, consiste à traiter le bouillon renfermant le Sulfure de plomb par l'acide azotique, mais pour éviter toute perte possible par départ d'hydrogène sulfuré sous l'influence de l'acide, il est utile d'adapter au ballon, un réfrigérant ascendant.

On porte à l'ébullition. Dès que le Sulfure de plomb est transformé, on enlève le réfrigérant après l'avoir rincé convenablement et on continue à chauffer comme il a été déjà dit pour oxyder complètement la matière organique. On complète l'oxydation par quelques centimètres cubes de Perhydrol, et on précipite ensuite le Soufre par le Chlorure de Baryum.

RÉSULTATS

S. total o/o

	Avant culture	Après culture
Bouillon N° 1	0.00721	0.00893
» N° 2	0.00825	0.00956
» N° 3	0.00790	0.00825

Les expériences ont été limitées à l'examen de trois bouillons. Il en résulte que le développement du Colibacille dans les milieuxensemencés paraît augmenter la proportion de Soufre dosable par le Chlorure de Baryum, dans les conditions de la méthode indiquée plus haut.

Cette augmentation est importante et nettement accusée dans les trois cas.

Il apparaît clairement que le micro-organisme attaque les complexes renfermant du Soufre, et les transforme en éléments pouvant subir ultérieurement très facilement, l'oxydation par la méthode à l'acide azotique.

On peut donc envisager que cette action conduit normalement à la transformation, en partie ou en totalité, du Soufre en hydrogène sulfuré, réaction qui pour certaines raisons à déterminer, peut être positive ou négative suivant les espèces considérées; et il apparaît déjà nettement que la Bactérie a une influence qui n'est pas négligeable sur les éléments renfermant du Soufre contenus dans le milieu.



CHAPITRE V

ÉTUDE DE LA RÉACTION

Les recherches qui vont suivre ont pour but de déterminer si certains éléments renfermant du Soufre, ajoutés aux milieux de culture, peuvent faciliter, activer, retarder ou empêcher la formation du Sulfure de plomb dans les milieux renfermant du sous-acétate de plomb.

Les produits utilisés pour réaliser ces expériences ont été les suivants :

Soufre sublimé pharmaceutique, bien lavé, exempt de SO^2 : 0.05 par tube.

Hyposulfite de sodium $\text{S}^2\text{O}^3 \text{Na}^2$, dans la proportion de 1 pour 100

Sulfite neutre de sodium cristallisé $\text{SO}^3 \text{Na}^2$ dans la proportion de 1 pour 100.

Sulfite acide de Sodium $\text{SO}^3 \text{NaH}$ dans la proportion de 1 pour 100

Sulfate de Sodium $\text{SO}^4 \text{Na}^2$ dans la proportion de 1 pour 100

Sulfate neutre de potassium $\text{SO}^4 \text{K}^2$ dans la proportion de 1 pour 100.

Sulfonal pulvérisé CH^3 $\begin{matrix} & \text{SO}^2 \text{C}^2 \text{H}^5 \\ & \text{SO}^2 \text{C}^2 \text{H}^5 \end{matrix}$ 0 g.05 par tube

Trional pulvérisé C^2H^5 $\begin{matrix} & \text{SO}^2 \text{C}^2 \text{H}^5 \\ & \text{SO}^2 \text{C}^2 \text{H}^5 \end{matrix}$ 0 g.05 par tube

Cystine $\text{S-CH}^2\text{-CH (NH}^2\text{) — COOH}$ 0.05 par tube
 $\quad \quad \quad |$
 $\quad \quad \quad \text{S-CH}^2\text{-CH (NH}^2\text{) — COOH}$

Les ensemencements ont été réalisés avec des Colibacilles d'origine différente sur le milieu classique dont la formule a été donnée précédemment, renfermant un des produits indiqués ci-dessus et du sous-acétate de plomb suivant la formule habituelle

Pour chaque série d'expériences, la même quantité de produit a été ajoutée dans chaque tube contenant 10 cc du même milieu gélosé - Une série de tubes témoins a été ensemencée en même temps afin de pouvoir constater par comparaison, la modification apportée à la réaction ou même au développement du Colibacille par le produit ajouté.

Etant donnés d'autre part, les chiffres différents obtenus dans les dosages de Soufre dans les milieux à l'eau distillée et les mêmes à l'eau de fontaine, j'ai réalisé pour chaque cas particulier, une série de réactions avec des milieux à l'eau distillée d'une part, et d'autre part, une deuxième série avec des milieux à l'eau de fontaine.

Les tubes sont placés à l'étuve à 37° C et examinés après 18 heures, 24 heures, 48 heures, 72 heures.

Les divers Colibacilles mis en culture sont désignés par des lettres correspondant à leur origine.

Les races C. L. H. G. m'ont été fournies par l'Institut Pasteur de Paris; la race N provient de M. LASSEUR, Professeur de Bactériologie à la Faculté de Pharmacie de Nancy.

Les races F. Selles, Anglais - Loire II, ainsi que les Paratyphiques A et B, ont été sélectionnées par le Dr. TECHOUHEYRES, Professeur à l'Ecole de Médecine et de Pharmacie de Reims (1).

(1) Mlle Pillement, assistante du Dr. Téhoueyres au Laboratoire de Bactériologie de l'Ecole de Reims, m'a apporté son aide précieuse dans de nombreuses manipulations, et je lui en exprime ma bien vive gratitude.

Ces divers Colibacilles, avant d'être mis en expérience dans les milieux préparés, ont été identifiés successivement à l'aide des réactions admises généralement pour caractériser l'espèce.

Les Tableaux I & II donnent la façon dont se comportent les diverses races mises en expérience, dans le milieu normal au plomb, et indiquent le moment de l'apparition de la coloration noire; ce sont les tubes témoins.

Les divers Tableaux qui ont été établis pour chaque expérience indiquent l'intensité et le moment de l'apparition de la coloration noire pour les Souches bactériennes mises en culture sur le milieu au plomb.

La durée de séjour à l'étuve figure en ordonnées .

A gauche de la ligne des heures, l'indication «négatif» est la région dans laquelle se placent naturellement pour les conditions données de l'expérience, les Souches qui agissent négativement sur le milieu.

La partie droite du Tableau comprend les Souches donnant une réaction positive.

Elle se divise en trois régions :

- a) — très légèrement positif,
- b) — légèrement positif,
- c) — positif.

Les initiales portées sur les différents tableaux servent à désigner les Souches utilisées :

F — Race F — Colibacille		L — Race L — Colibacille
G — Race G »		S — Race Selles «
N — Race N »		A — Race Anglais «
O — Race Loire II »		PA — Paratyphique A
C — Race C, »		PB — Paratyphique B

Le point d'apparition des colonies de chaque Souche est indiqué par le début de la courbe avec la lettre correspondante

TABLEAU I

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

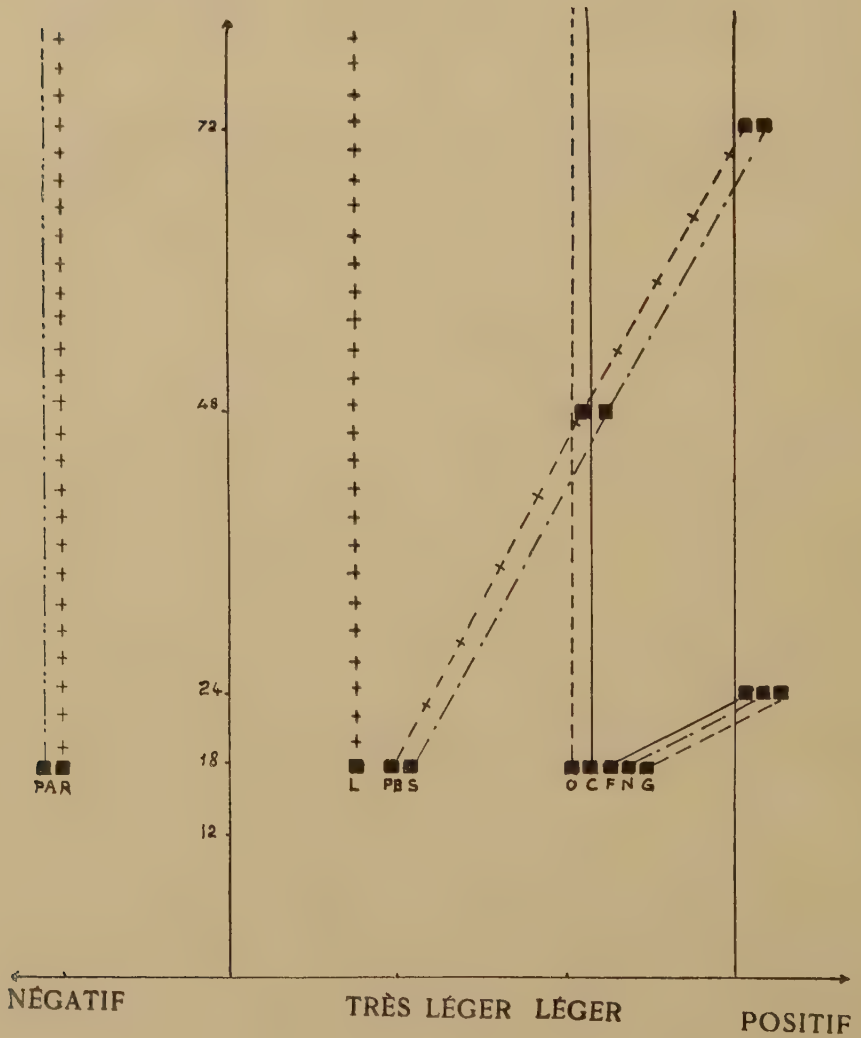


TABLEAU I

MISE EN CULTURE DES DIVERSES SOUCHES SUR LE MILIEU AU PLOMB

Préparé avec l'eau distillée

Sur les 8 Souches de Colibacille mises en expérience, une seulement est nettement négative sur le milieu intéressé ainsi que la Souche de Paratyphique A.

Les autres fournissent des résultats positifs plus ou moins accusés. La Souche L reste dans la zone très légèrement positive, les Souches O & C ne sont que légèrement positives, les Souches F. N. G. sont positives dès la 24ème heure, alors que la Souche S et le Paratyphique B ne deviennent positifs qu'après 3 jours.

TABLEAU II

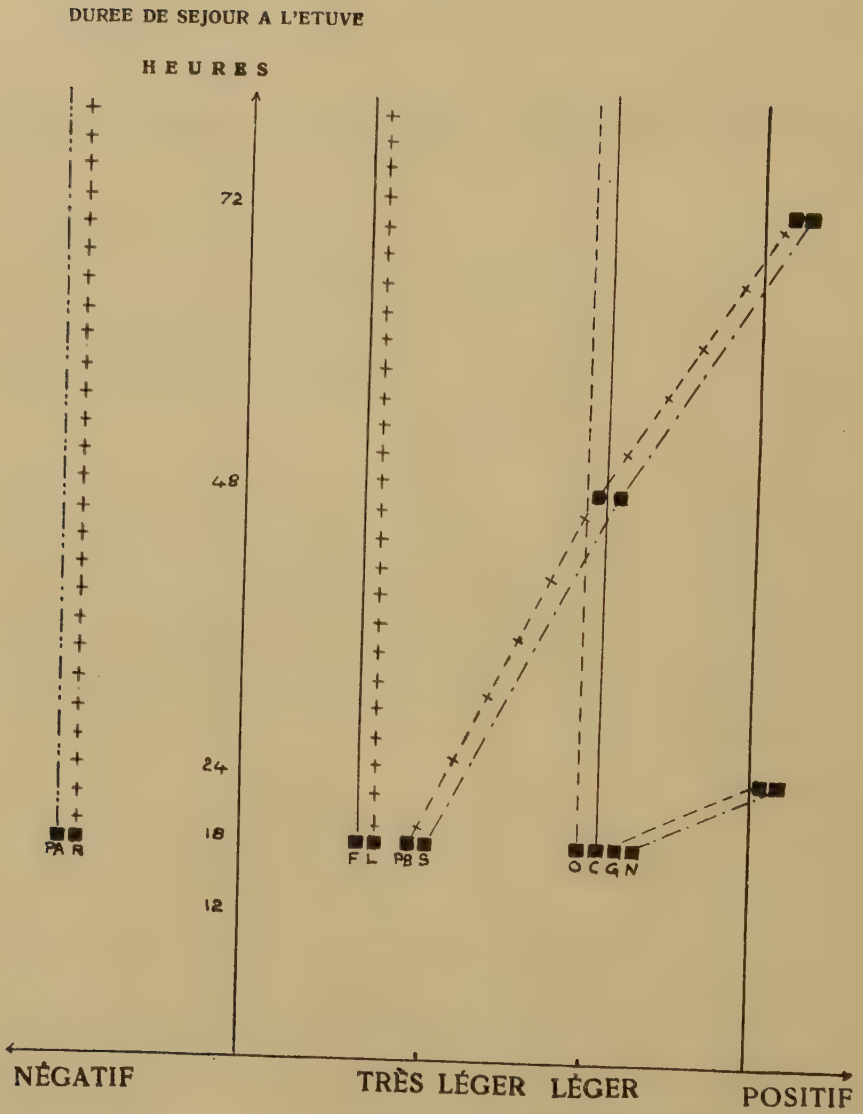


TABLEAU II

MISE EN CULTURE DES DIVERSES SOUCHES SUR LE MILIEU AU PLOMB

Préparé avec l'eau de fontaine

L'aspect dans l'ensemble est sensiblement le même que pour les expériences dans le milieu à l'eau distillée; Une seule Souche donne un résultat un peu différent, la Souche F, qui est positive après 24 heures au Tableau I n'est ici que très légèrement positive. Elle reste sans changement après 3 jours,

Les Tableaux I et II rendent compte de l'action des diverses Souches de Colibacille et des deux Paratyphiques A & B sur le milieu au plomb classique, préparé, soit avec de l'eau distillée, soit avec de l'eau de fontaine.

Dans les pages qui vont suivre, on trouvera les résultats obtenus dans les différentes expériences effectuées sur le même milieu, auquel il a été ajouté successivement, divers produits renfermant l'élément Soufre.

TABLEAU III

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

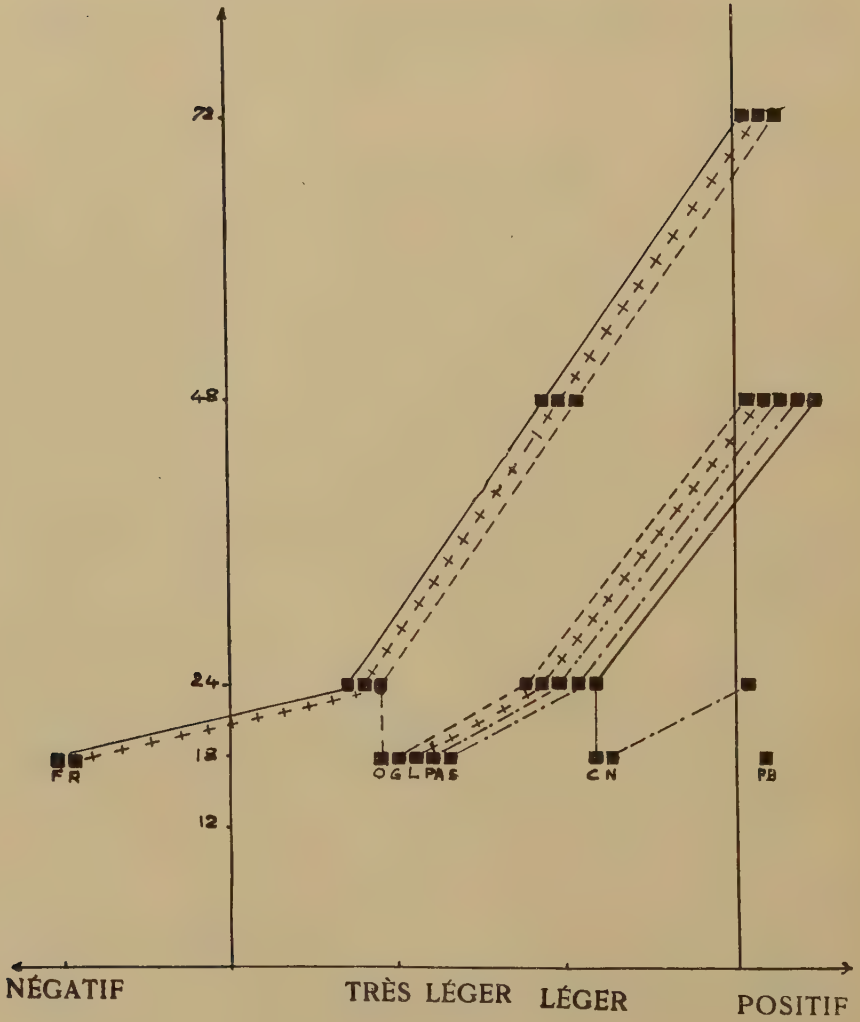


TABLEAU III

ADDITION DE FLEUR DE SOUFRE

Eau distillée

On a pris la Fleur de Soufre des Pharmacies préalablement bien lavée à l'eau distillée, pour la débarrasser de toutes traces de composés solubles.

On a ajouté 0 g 05 par tube avant stérilisation.

Le résultat est frappant. Toutes les espèces sont positives, après 72 heures. Celles qui, dans les tableaux I & II ne donnent la réaction que d'une façon très faible, sont largement favorisées par l'addition de Soufre dans les milieux de culture.

Le Colibacille, Souche Anglais, en particulier, négatif dans les tubes témoins, donne une réaction positive après 3 jours.

L'action des deux Paratyphiques est aussi nettement améliorée.

TABLEAU IV

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE

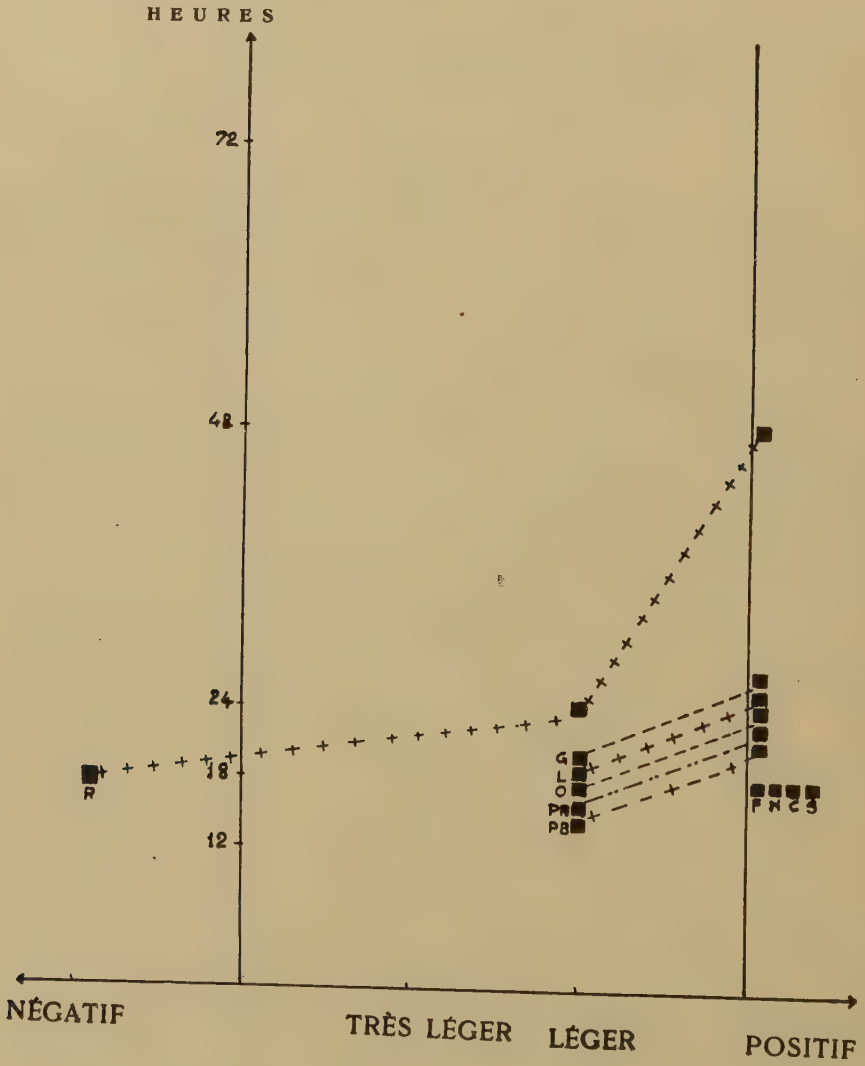


TABLEAU IV

ADDITION DE FLEUR DE SOUFRE

Eau de fontaine

Les effets observés sont sensiblement du même ordre que ceux obtenus dans les milieux préparés à l'eau distillée (Tableau III), mais plus accusés.

Sauf la Souche Anglais, qui devient positive vers la 48ème heure, les autres Colibacilles ainsi que les deux Paratyphiques sont positifs après 24 heures.

Il y a lieu de constater à propos de l'addition de Soufre métalloïde aux milieux de culture, que la Bactérie trouve ici un élément simple sur lequel elle n'a qu'à fixer l'Hydrogène pour donner ensuite la réaction colorée au sulfure de plomb. Elle n'a nullement besoin de transformer les composés renfermant du Soufre, et, en général, l'apparition de la coloration est assez rapide.

TABLEAU V

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

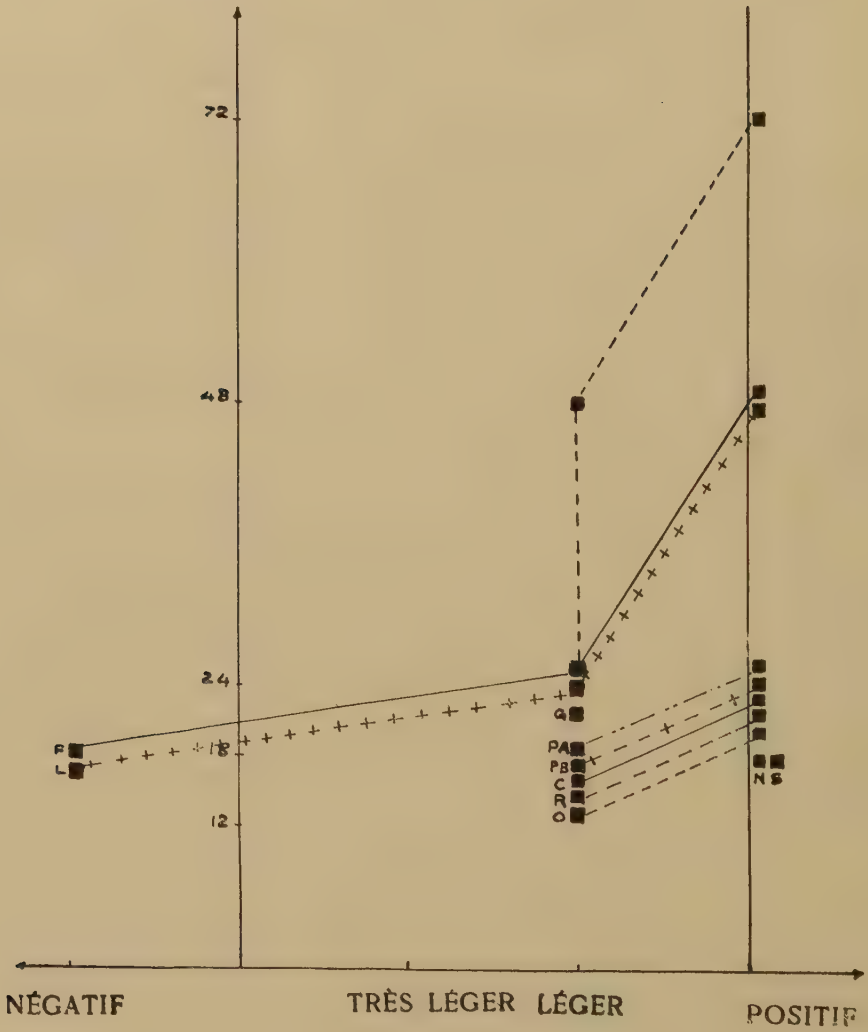


TABLEAU V

ADDITION D'HYPOSULFITE DE SODIUM

Eau distillée

La présence d'Hyposulfite de Sodium dans les milieux à l'eau distillée donne pour certaines Races, une allure tout à fait particulière. On remarque que 2 Espèces sont d'abord négatives F. et L., alors qu'elles ne le sont pas normalement dans les tubes témoins. Elles deviennent nettement positives après 48 heures. Les Espèces N & S. donnent très rapidement une réaction positive, et les Espèces C. A. O. et Paratyphique A. Paratyphique B la donnent après 24 heures.

Il apparaît que l'agent ajouté dans les milieux de cette série apporte comme le Soufre lui-même, une amélioration sensible à la marche de la réaction, mais la vitesse d'apparition de la coloration est variable, suivant les Espèces envisagées.

ADDITION D'HYPOSULFITE DE SODIUM

Eau de Fontaine

Il n'a pas été possible de réaliser les mêmes expériences avec le milieu à l'eau de fontaine, les tubes additionnés d'hyposulfite de sodium, ayant noirci uniformément à la stérilisation.

TABLEAU VI

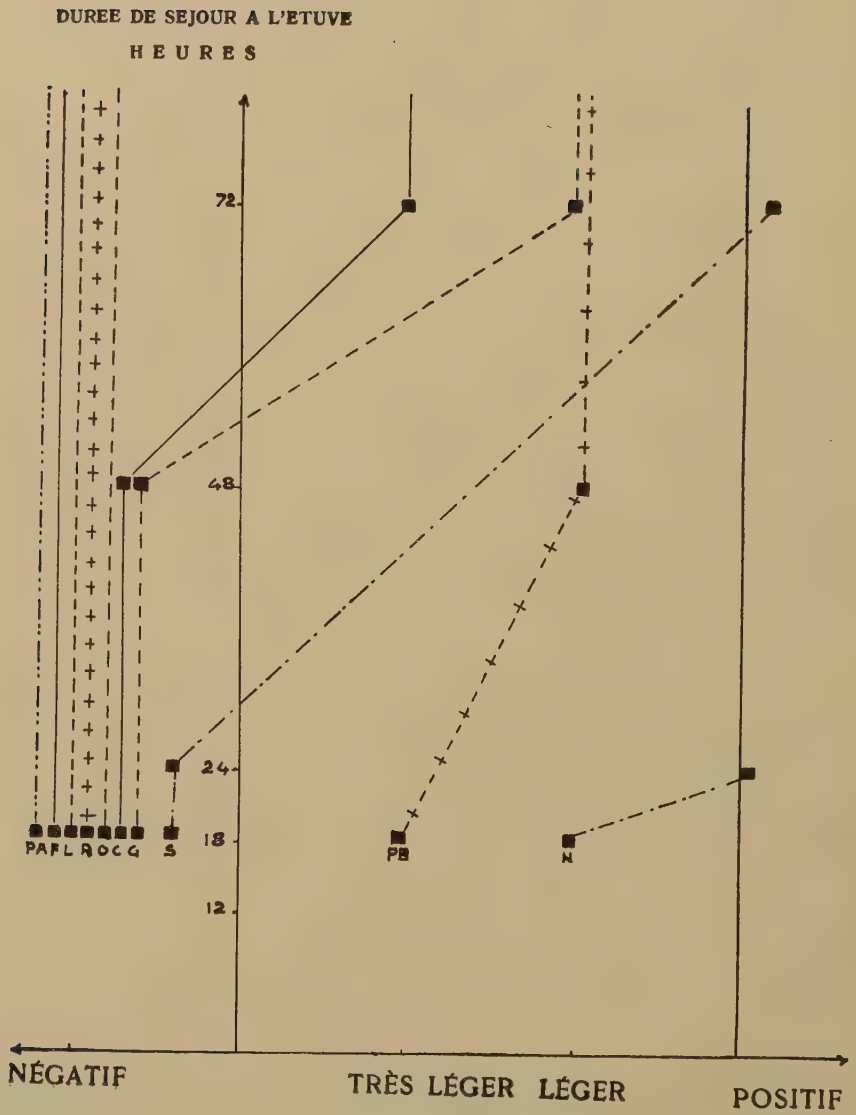


TABLEAU VI

ADDITION DE SULFITE NEUTRE DE SODIUM

Eau distillée

L'aspect du tableau fait apercevoir de prime abord un fait assez curieux et qui cependant n'a aucune relation avec le développement des cultures, qui paraît être absolument normal; c'est que l'apparition de la coloration noire est fortement retardée pour la généralité des tubesensemencés.

La réaction est complètement négative même après 4 jours pour les Races de Colibacille F. L. O. - La Race A, normalement négative, devenue positive avec le Soufre, puis avec l'Hyposulfite est devenue à nouveau négative. Seule, la Race N donne un résultat positif le premier jour.

Le Paratyphique A normalement négatif dans les milieux ordinaires est resté négatif, et le Paratyphique B est légèrement positif après 24 heures.

En résumé, l'action du Sulfite neutre de Sodium est assez généralement retardatrice.

TABLEAU VII

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

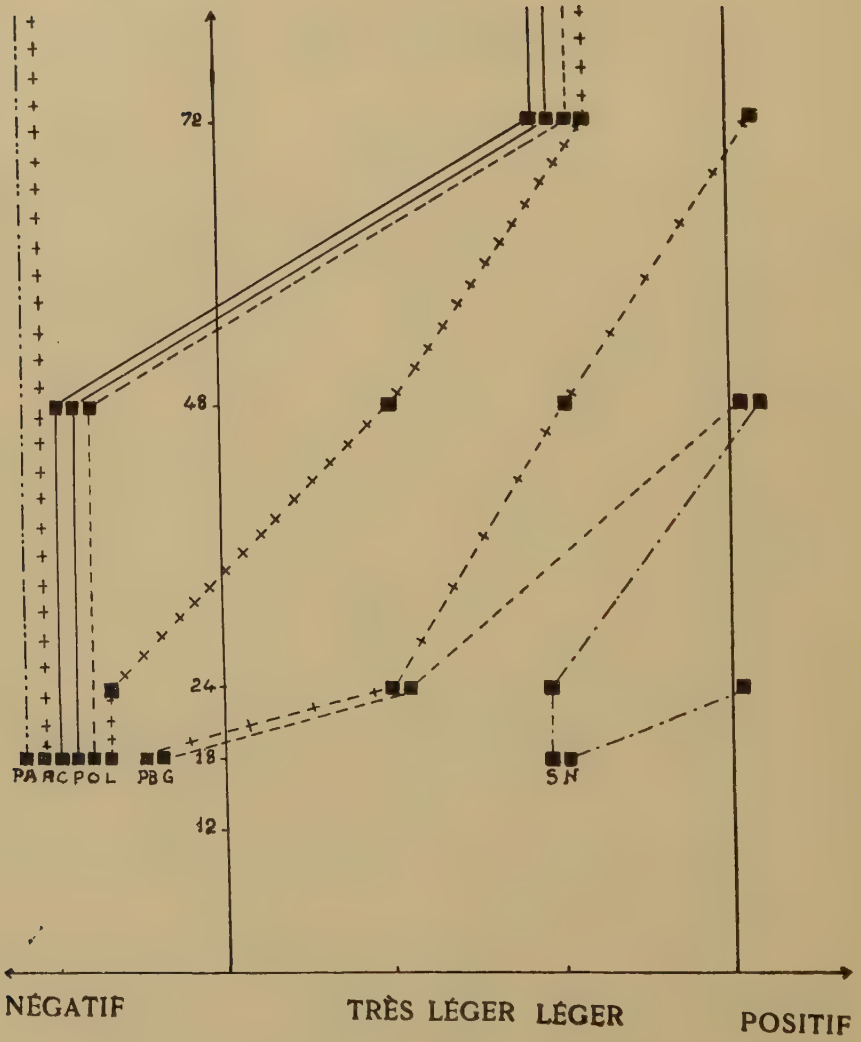


TABLEAU VII

ADDITION DE SULFITE NEUTRE DE SODIUM

Eau de fontaine

L'allure générale de la réaction se rapproche beaucoup de celle de la précédente (Tableau VI). Cependant, des quelques Espèces de Colibacille rendues négatives après 24 heures, une seule A. reste définitivement négative; il en est de même pour le Paratyphique A; les autres, contrairement à ce qui s'est passé pour les milieux à l'eau distillée, deviennent légèrement positives après le 3ème jour.

Il semble donc que dans les cultures à l'eau de fontaine le Sulfite neutre de Sodium exerce une action retardatrice beaucoup moins accusée que dans les milieux à l'eau distillée.

Il faut bien admettre que cette différence est due uniquement à la présence de l'eau de fontaine puisque les autres éléments entrant dans la réaction n'ont pas varié, ni de quantité, ni de qualité.

TABLEAU VIII

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

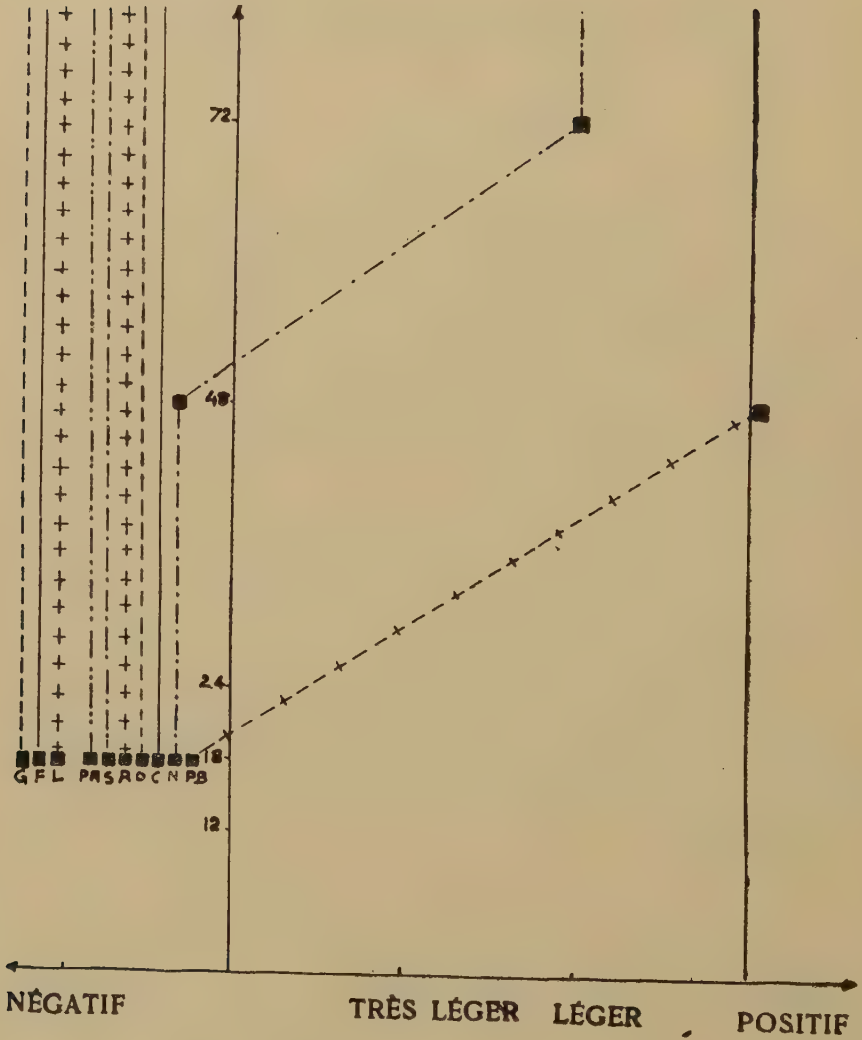


TABLEAU VIII

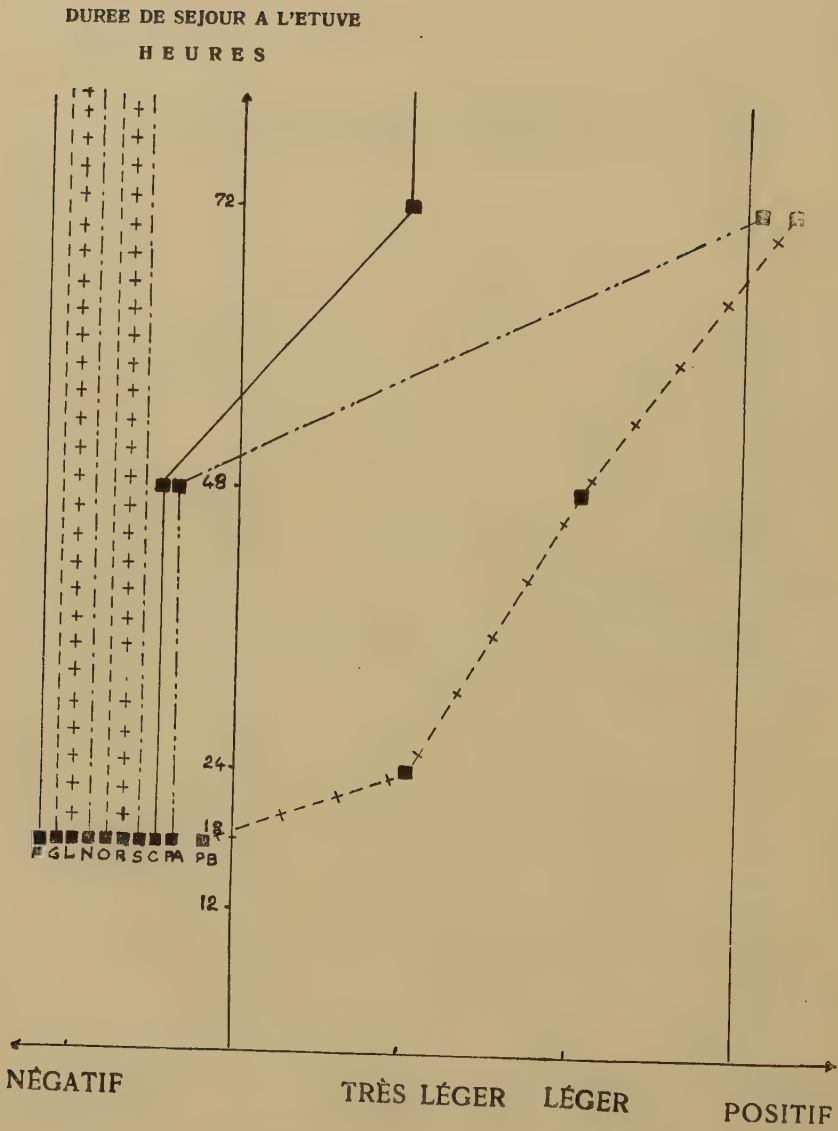
ADDITION DE SULFITE ACIDE DE SODIUM

Eau distillée

L'action du Sulfite acide de Sodium a une influence nettement défavorable. L'Espèce N, seule parmi les Colibacilles donne une légère coloration après 3 jours de culture . Le Paratyphique B est nettement positif après 48 heures.

Comme pour le Sulfite neutre, les cultures ne sont pas tuées par le produit ajouté, car après 3 jours de séjour à l'étuve il a été possible d'obtenir avec les milieux en tubes non colorés, de nouvelles cultures par ensemencement sur bouillon.

TABLEAU IX



TABEAU IX

ADDITION DE SULFITE ACIDE DE SODIUM

Eau de Fontaine

Les résultats obtenus avec les milieux à l'eau de fontaine sont ici très comparables à ceux obtenus avec les milieux à l'eau distillée (Tableau VIII).

Il semble, contrairement à certaines des expériences précédentes, que le véhicule n'ait pas ici une grande influence et que seul le produit ajouté apporte une perturbation sérieuse à l'action du Micro-organisme sur les molécules soufrées; perturbation qui se traduit généralement par l'absence de coloration noire.

Cependant, ce même produit ne paraît en aucune façon gêner la réaction pour les Paratyphiques A et B. Les deux sont nettement positifs, le Paratyphique B accusant une coloration déjà après 24 heures, le Paratyphique A seulement après 72 heures.

TABLEAU X

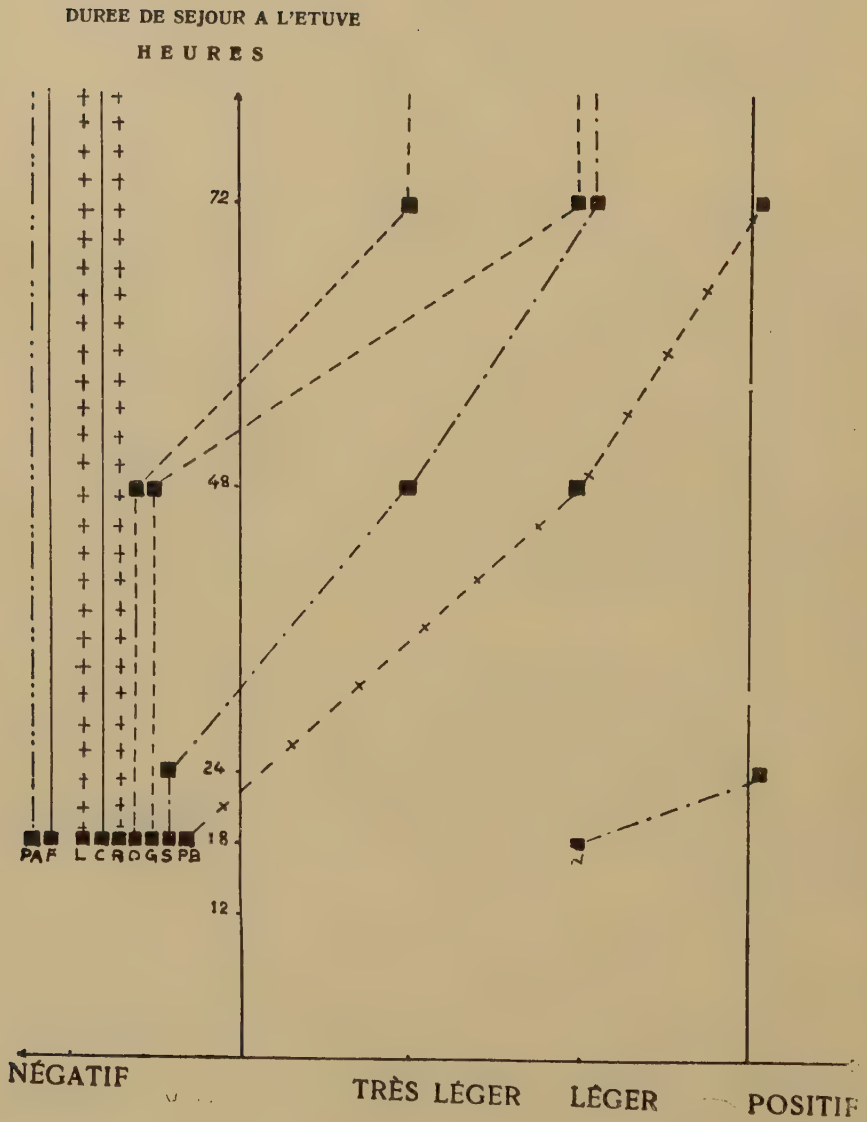


TABLEAU X

ADDITION DE SULFATE DE SODIUM

Eau distillée

L'action du Sulfate de Sodium ne parait pas faciliter la formation du Sulfure de plomb.

Sur les 8 Races de Colibacille mises en culture, 4 restent négatives après 4 jours. Une seule, N est positive après 24 heures.

Le Paratyphique B est légèrement positif après 24 heures, le Paratyphique A reste négatif.

TABLEAU XI

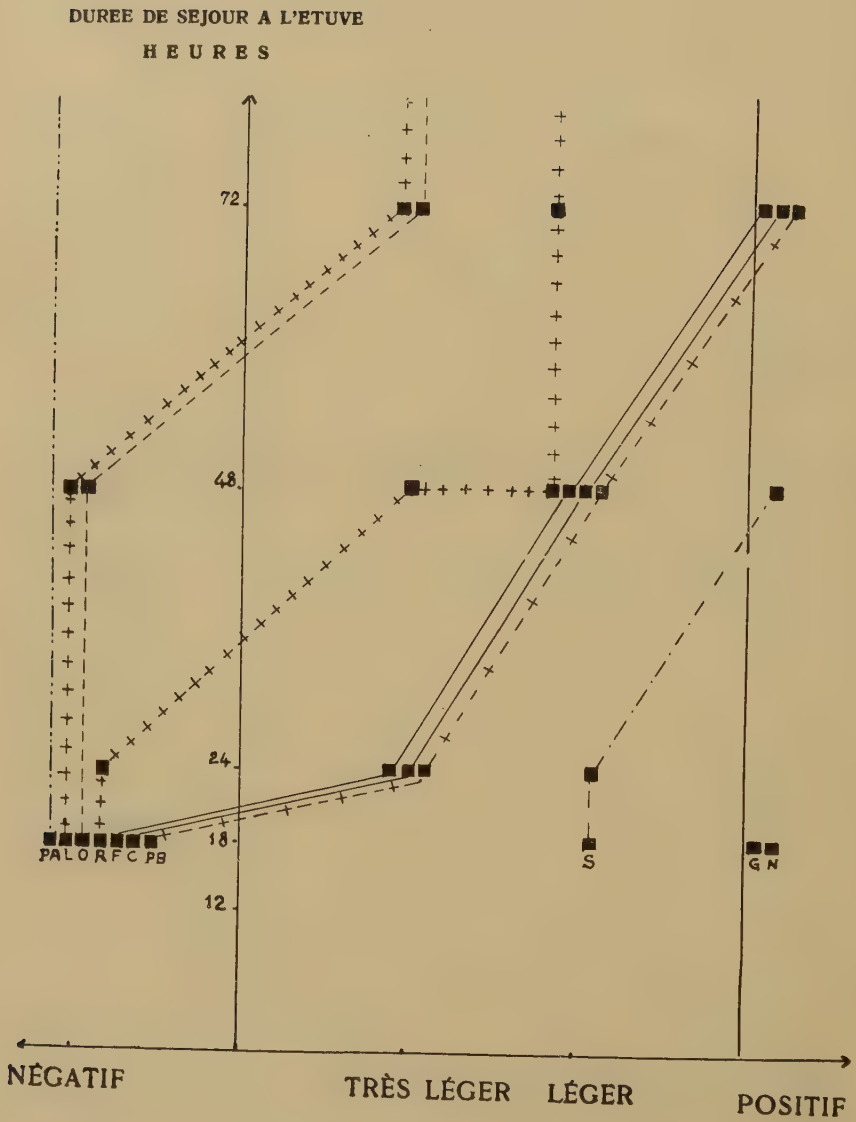


TABLEAU XI

ADDITION DE SULFATE DE SODIUM

Eau de fontaine

Les expériences préparées avec des milieux à l'eau de fontaine donnent des résultats nettement différents de ceux obtenus dans les mêmes conditions avec l'eau distillée (Tableau X).

Bien qu'il y ait cependant des retards nettement accusés par comparaison avec les tubes témoins, il y a toutefois une amélioration notable sur les épreuves à l'eau distillée.

C'est ainsi que les Races G & N, sont très rapidement positives.

Seul le Paratyphique A reste négatif.

TABLEAU XII



TABLEAU XII

ADDITION DE SULFATE DE POTASSIUM

Eau distillée

Nous retrouvons ici des réactions parfaitement comparables à celles obtenues avec le Sulfate de Sodium (Tableau X), bien qu'elles soient cependant assez lentes pour la généralité des tubes.

Une seule Race, parmi les Colibacilles, est nettement positive peu de temps après l'ensemencement, celle qui a déjà été signalée pour le Sulfate de Sodium (Race N).

De même, le Paratyphique B n'est que légèrement positif après 48 heures, alors que le Paratyphique A reste négatif.

TABLEAU XIII

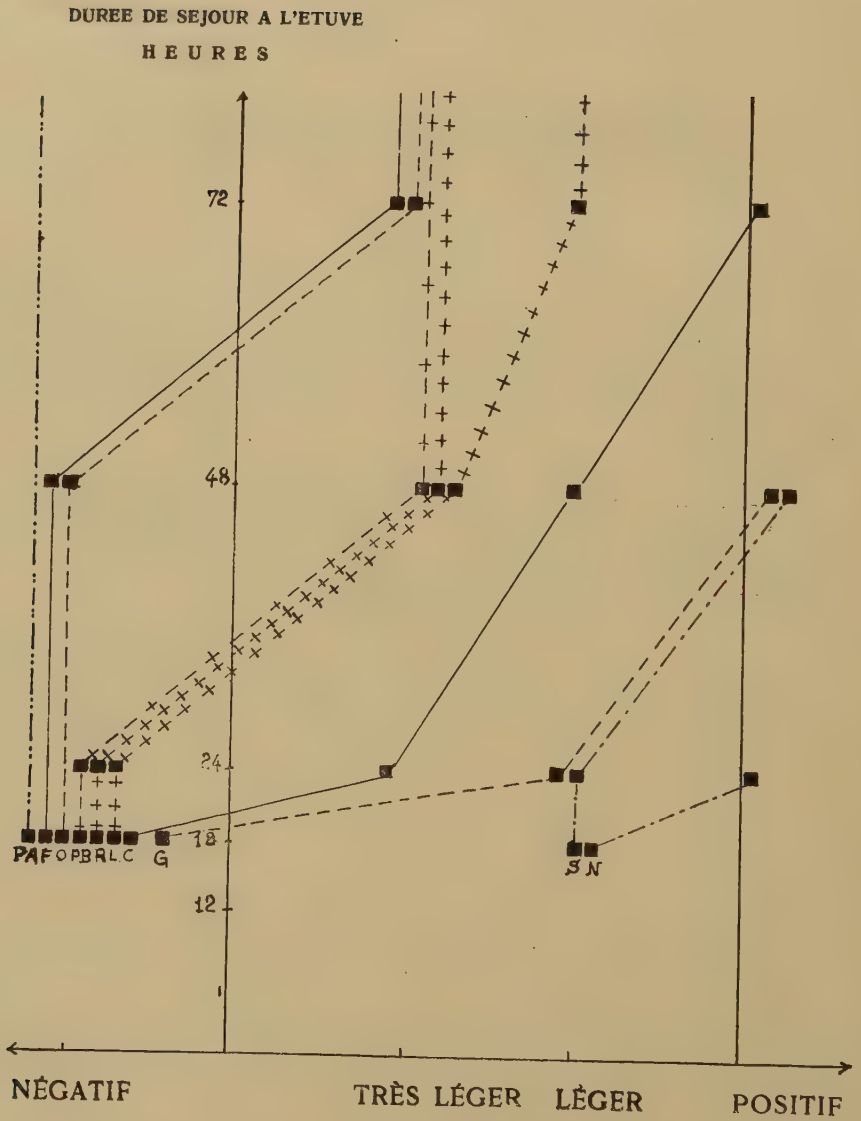


TABLEAU XIII

ADDITION DE SULFATE DE POTASSIUM

Eau de fontaine

Les milieux préparés à l'Eau de fontaine présentent une différence avec les milieux à l'Eau distillée qui est du même ordre que celle déjà constatée à propos des expériences avec le Sulfate de Sodium (Tableaux X & XI).

L'Eau de fontaine semble favoriser l'apparition de la coloration noire pour la généralité des Races, contrairement à ce qui se passe pour les tubes à Eau distillée.

Et, on peut conclure de cette dernière série d'expériences que le Potassium entré en combinaison dans le composé Soufré, agit sensiblement de la même façon que le Sodium. Il apparait nettement que le groupement qui importe dans la réaction, est le groupement Soufré.

Nous venons de voir que :

1) Les expériences avec le Sulfate de Potassium d'une part, et le Sulfate de Sodium d'autre part, donnent sensiblement les mêmes résultats.

2) Ces expériences, comparées avec celles des tubes témoins, accusent un retard très net et assez général dans l'apparition de la coloration.

3) Si nous examinons ensuite les résultats fournis par les tubes auxquels on a ajouté des composés sulfureux, (Sulfite neutre et Sulfite acide) on constate qu'il y a de fortes analogies entre les résultats fournis par les tubes au Sulfite neutre et les tubes aux Sulfates.

Par contre, le Sulfite acide accuse des résultats négatifs beaucoup plus nets.

Afin de savoir si l'action des deux composés peut se surajouter, et augmenter encore la difficulté de certaines Espèces à réagir positivement sur les milieux, il a été introduit dans les tubes de culture un mélange de solution de Sulfate de Sodium (1 o/o) et de Sulfite de Sodium (1 o/o).

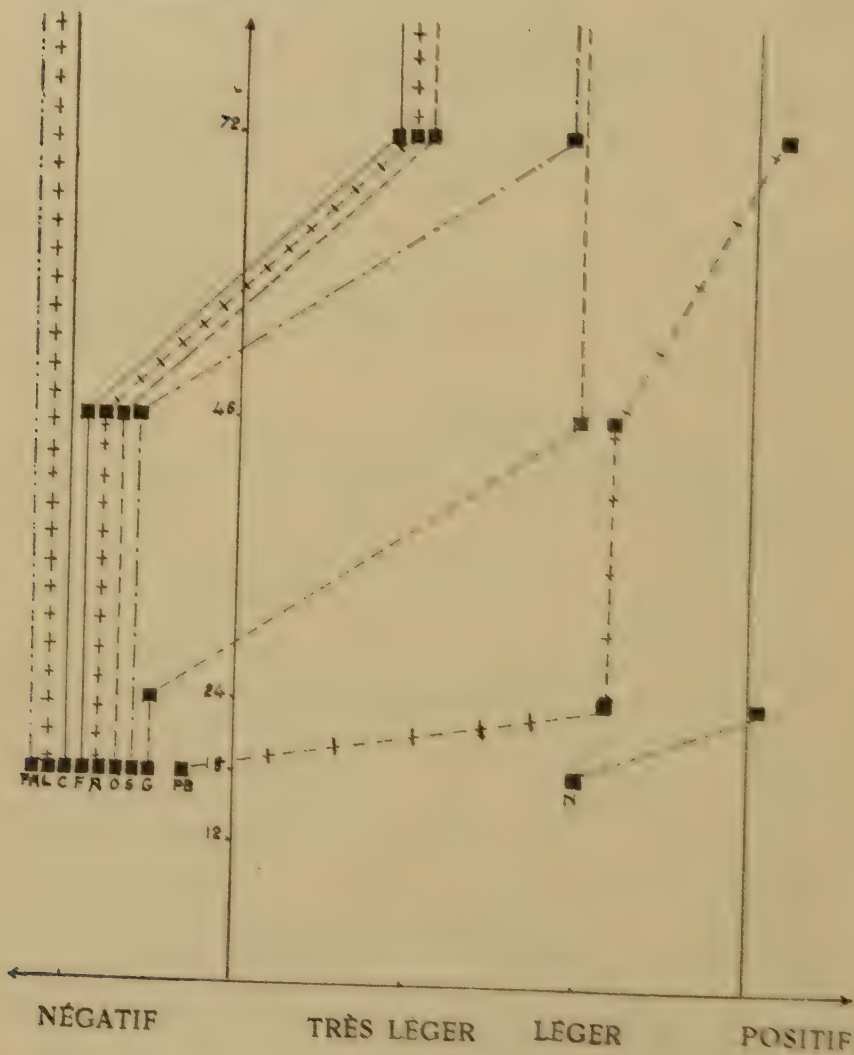
Une 2ème série a été préparée avec un 2ème mélange de Sulfate de Sodium (1 o/o) et de Sulfite acide de Sodium (1 o/o).

Les expériences ont été répétées pour chaque série dans l'eau distillée et dans l'eau de fontaine.

Les résultats sont exprimés dans les graphiques suivants:

TABLEAU XIV

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE
H E U R E S



TABEAU XIV

ADDITION DE SULFATE DE SODIUM ET SULFITE NEUTRE DE SODIUM

Eau Distillée

La modification apportée au milieu donne des résultats qui paraissent améliorer la situation observée précédemment soit dans les tubes au Sulfite, soit dans les tubes au Sulfate.

Le nombre des Espèces négatives après le 3ème jour est beaucoup plus faible.

TABLEAU XV

DURÉE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

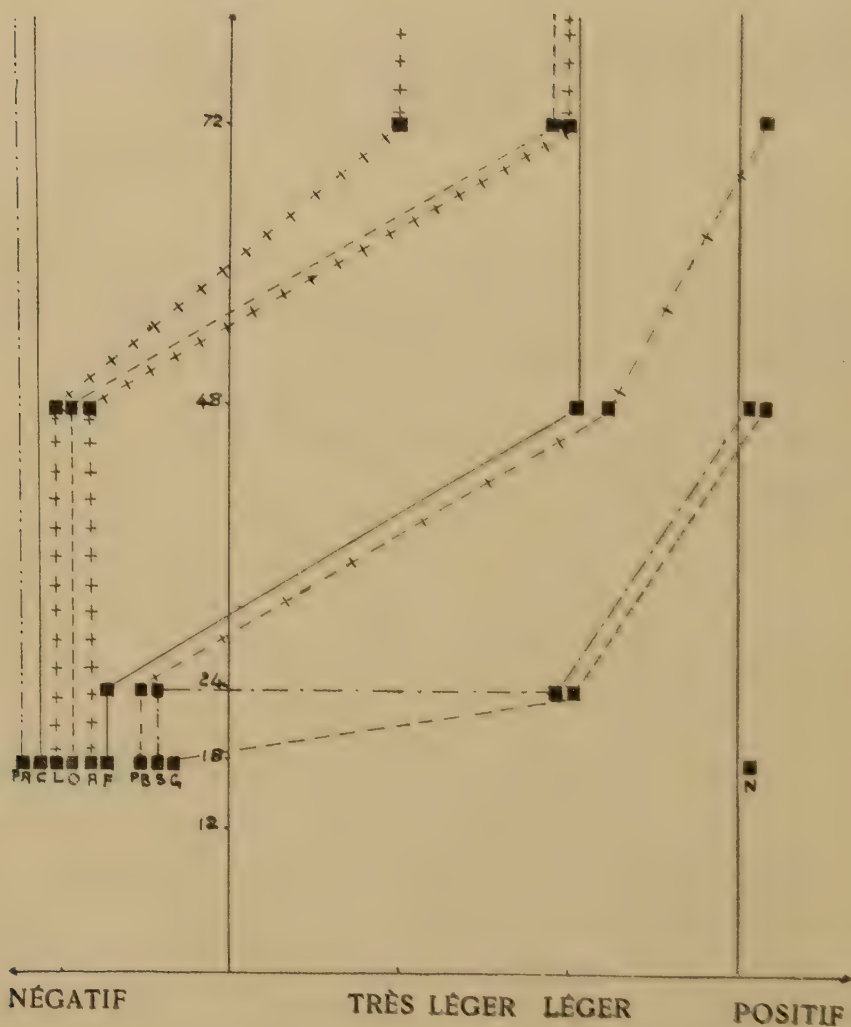


TABLEAU XV

ADDITION SE SULFATE DE SODIUM ET SULFITE NEUTRE DE SODIUM

Eau de Fontaine

L'action des milieux préparés à l'Eau de fontaine contenant le mélange Sulfate et Sulfite neutre de Sodium paraît favoriser la réaction avec une certaine amélioration sur les résultats obtenus par les mêmes milieux préparés à l'Eau distillée (Tableau XIV).

Une seule Souche de Colibacille, la Souche C reste négative après 4 jours de séjour à l'étuve.

Les Paratyphiques A et B réagissent de la même façon que dans les milieux analogues à l'Eau distillée.

TABLEAU XVI

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

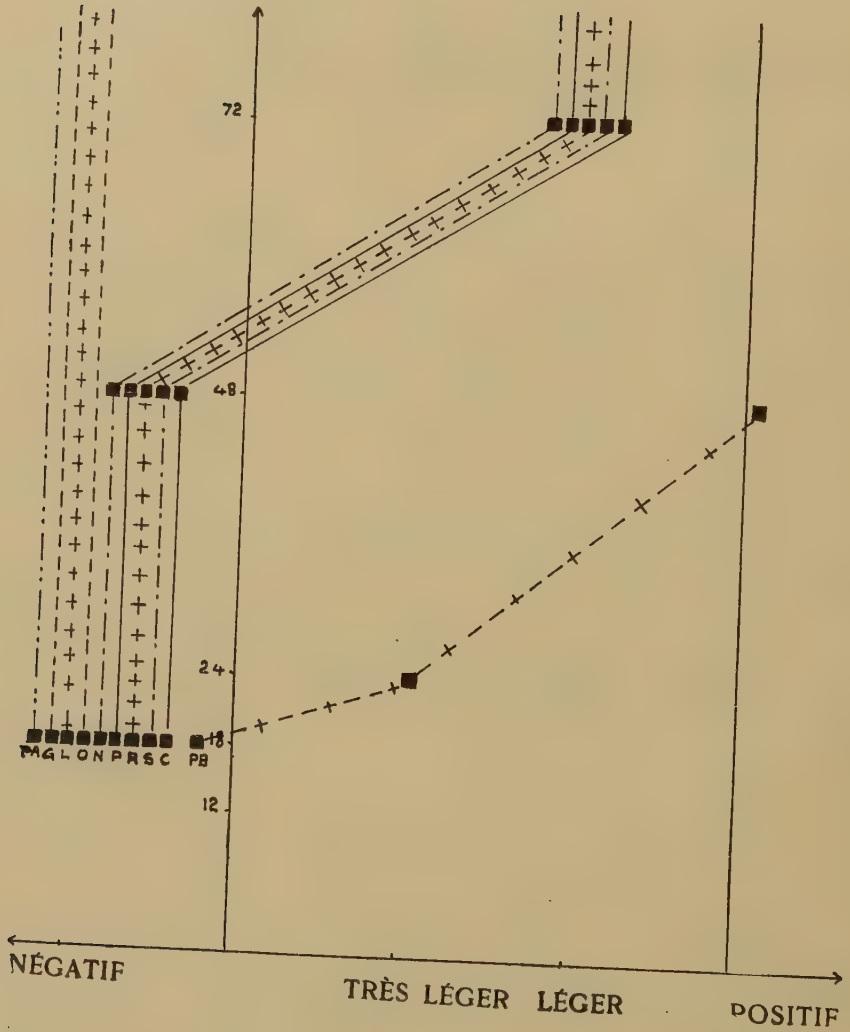


TABLEAU XVI

ADDITION DE SULFATE DE SODIUM ET SULFITE ACIDE DE SODIUM

Eau distillée

Les résultats restent comparables à ceux obtenus avec les Sulfates seuls ou avec le Sulfite acide de Sodium, avec cependant quelques différences de détail.

On obtient une réaction qui n'est que légèrement positive pour 5 souches de Colibacille, après 3 jours; Les tubes du Paratyphique B seuls sont nettement colorés après 48 heures.

TABLEAU XVII

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

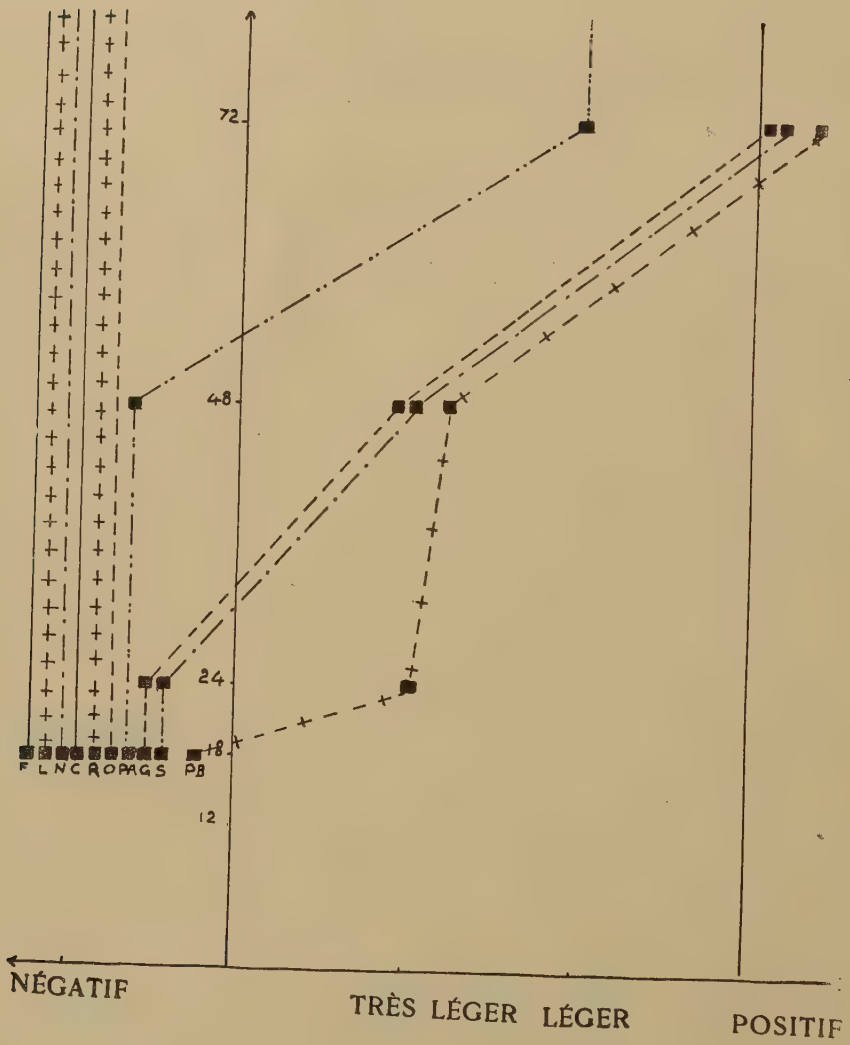


TABLEAU XVII

ADDITION DE SULFATE DE SODIUM ET SULFITE ACIDE DE SODIUM

Eau de fontaine

Le mélange Sulfate et Sulfite acide de Sodium dans les milieux préparés à l'Eau de fontaine accuse un arrêt dans la réaction, contrairement à ce qui s'est passé dans les mêmes milieux à l'Eau distillée. (Tableau XVI).

Après 4 jours, il y a bien 2 Souches de Colibacille qui donnent un résultat positif, mais les autres restent négatives.

Les Paratyphiques deviennent positifs tous les deux.

Dans les expériences réalisées avec les mélanges : Sulfate-Sulfite neutre et Sulfate-Sulfite acide, les actions de chacun de ces éléments ne se superposent pas, et contrairement à ce que l'on aurait pu croire, ces mélanges introduits dans les cultures ne modifient pas sensiblement les réactions obtenues avec chacun de ces produits pris isolément.

Afin de déterminer si certains composés Soufrés à structure organique ne seraient pas plus favorables à la réaction, que les composés minéraux, j'ai introduit dans les milieux de culture de petites quantités de Sulfonal et de Trional.

Deux séries de tubes de gélose ont été ainsi préparées l'une avec du Sulfonal, l'autre avec du Trional, dans les proportions indiquées p. 36. Les produits ont été pulvérisés, puis introduits dans les tubes avant stérilisation.

Comme pour les précédentes expériences, il a été effectué une série d'essais pour chaque produit avec de l'Eau distillée, et une autre avec de l'Eau de fontaine.

Le Sulfonal et le Trional ont été choisis en raison de leur constitution moléculaire. On pouvait espérer que le Bacille pourrait dissocier plus facilement les molécules Soufrées et s'emparer du Soufre pour en faire rapidement du Sulfure de plomb.

Il n'en a rien été.

TABLEAU XVIII

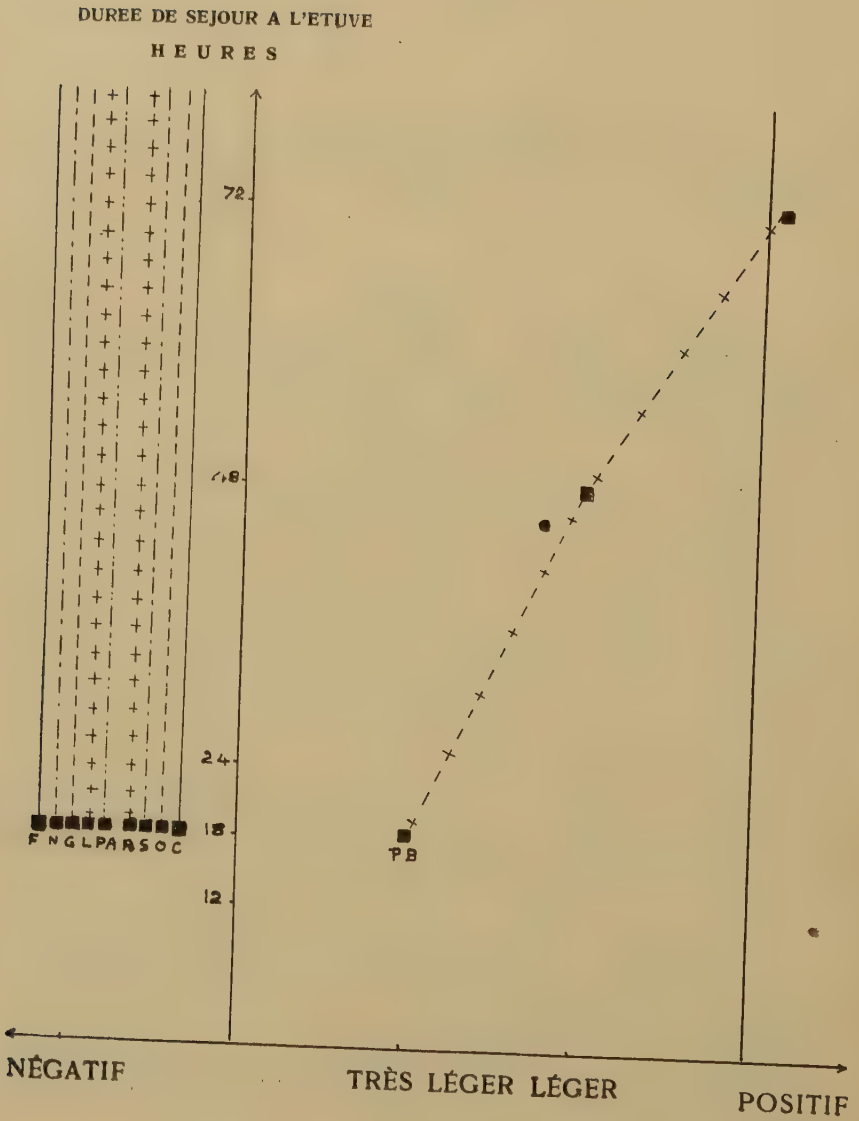


TABLEAU XVIII

ADDITION DE SULFONAL OU DE TRIONAL

Tous les tubesensemencés par les diverses Races de Colibacille sont restés négatifs dans les 2 cas, c'est-à-dire aussi bien en présence du Sulfonal, qu'en présence du Trional, qu'il s'agisse des milieux à l'Eau distillée ou des milieux à l'Eau de fontaine.

Le Paratyphique A est également négatif, seul le Paratyphique B est positif après 72 heures.

TABLEAU XIX

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

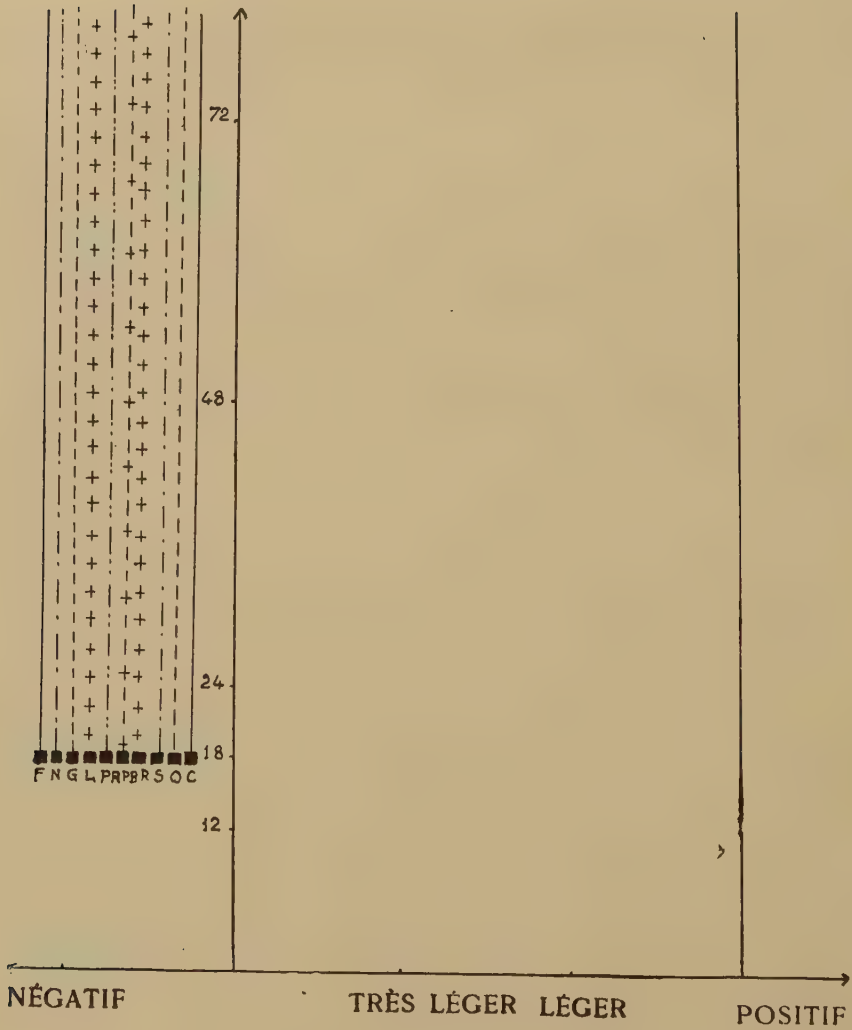


TABLEAU XIX

Pour tenter de connaître quelle pouvait être la cause des différents résultats obtenus dans les expériences précédentes, selon qu'on emploie de l'Eau distillée ou de l'Eau de fontaine pour la préparation des milieux de culture. il a été ajouté au bouillon préparé avec de l'Eau distillée, du Chlorure de Calcium et du Chlorure de Magnésium dans la proportion de 1 gr. par litre de chacun de ces deux éléments.

Les résultats obtenus ont été tous négatifs. Il semble donc que les Electrolytes ajoutés empêchent la réaction, aussi bien pour les Souches de Colibacille que pour les deux Paratyphiques.

TABLEAU XX

DUREE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

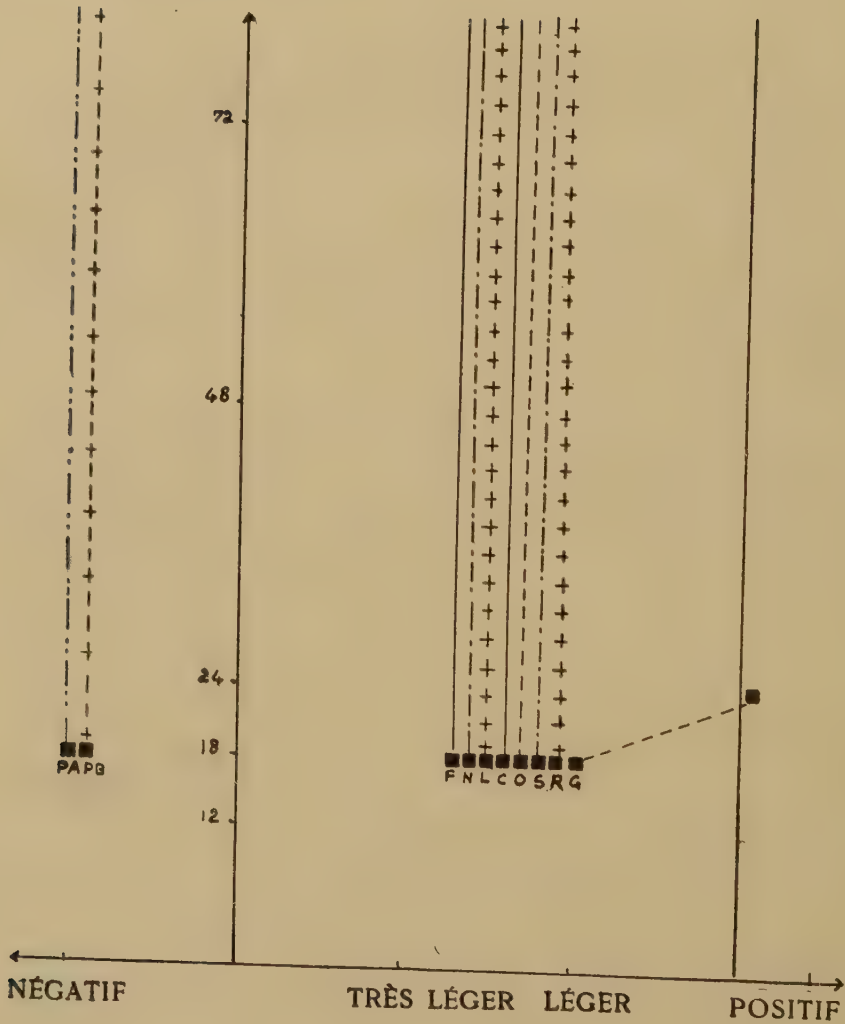


TABLEAU XX

Pour compléter les expériences correspondant au Tableau XIX, une autre série a été tentée avec des milieux à l'Eau de fontaine dans laquelle les Sels alcalino-terreux avaient été préalablement précipités par la quantité juste suffisante d'Oxalate de Sodium.

L'eau ainsi débarrassée, sert ensuite à préparer le milieu gélosé comme il a été indiqué.

Seule la Race G dans ces conditions donne des tubes rapidement positifs, les autres Souches de Colibacille fournissent une réaction très légèrement positive.

Par contre, les Paratyphique A et B restent négatifs.

CHAPITRE VI

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS OBTENUS

Nous avons vu que les différents composés chimiques renfermant du Soufre apportent dans le développement des différentes Races de Colibacille, des perturbations assez curieuses.

Alors que l'on pouvait espérer, au premier abord, que l'introduction de ces éléments devait favoriser la mise en liberté d'H²S et amener rapidement l'apparition de la coloration noire recherchée, c'est le contraire qui s'est produit dans certains cas. Et, d'une façon générale, si l'on excepte les expériences avec le Soufre et l'Hyposulfite, l'apport des composés Soufrés n'a pas semblé améliorer la réaction.

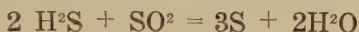
Il est d'autre part un fait important à signaler, c'est que tous les composés introduits dans les milieux n'ont apporté aucune entrave à l'évolution des Micro-organismes considérés. Ils ne peuvent pas par conséquent, être regardés comme des antiseptiques au sens biologique du mot, en tenant compte toutefois des quantités auxquelles ils ont été utilisés. Dans toutes les expériences signalées, l'évolution du Bacille a été nettement observée, et sa vitalité constatée par les examens microscopiques régulièrement effectués.

Le retard dans l'apparition de la coloration noire ou son absence constatée dans d'autres cas, ne peut provenir par conséquent d'un arrêt dans l'évolution du Bacille, arrêt qui aurait pu être provoqué par l'action du produit considéré comme antiseptique.

Il s'agit évidemment d'un tout autre phénomène.

1) HYPOTHÈSE DE LA MISE EN LIBERTÉ D'ACIDE SULFUREUX

Etant donnés les résultats généralement négatifs obtenus dans les milieux contenant des composés à noyau sulfureux, faut-il émettre l'hypothèse de la destruction de l'hydrogène sulfuré suivant la formule classique :



En d'autres termes, peut-on admettre que l'acide sulfureux provenant des sels ajoutés (Sulfites, Sulfates) est lui-même réduit par l'hydrogène sulfuré, normalement mis en liberté? Et ce dernier disparaissant ainsi au fur et à mesure de sa formation, n'agit plus sur le sel plombique en rendant la réaction négative.

Dans ces conditions, il n'est plus possible d'avoir de réactions positives que, si l'hydrogène sulfuré mis en liberté, est en excès par rapport à l'acide sulfureux du milieu.

Alors, le cas peut-il se produire aussi dans les milieux sans apport de composés à noyau sulfureux, selon les qualités de l'espèce considérée?

Il faudrait admettre toutefois que le Bacille puisse produire simultanément ou alternativement SO^2 et H^2S , propriété qui, à première vue paraît cependant toute paradoxale.

Il est certain que l'hypothèse peut paraître tout à fait plausible pour les milieux renfermant les composés à groupement SO^3 (Sulfates) et à plus forte raison pour ceux renfermant le groupement SO^2 (Sulfites, Sulfonal, Trional).

Il devenait alors tout à fait intéressant de tenter de la vérifier par des essais de mise en évidence de l'acide sulfureux.

A cet effet, on a choisi des espèces réputées négatives quant à la réaction au plomb.

Après vérification de leurs caractères généraux, on ense-
mence chaque espèce sur un litre de bouillon renfermant de
l'acétate de plomb. Tous les jours, pendant 3 à 5 jours, on pré-
lève 100 cc. du liquide que l'on filtre et que l'on soumet à la
distillation. (1).

Le ballon et le réfrigérant destiné à condenser les vapeurs
ont été préalablement passés au mélange SO^4H^2 et MnO^4K ,
puis lavés ensuite abondamment à l'eau distillée récente. On
recueille alors le liquide condensé dans un tube contenant 5
cc. d'eau iodée, diluée et on distille chaque fois 10 à 15 cc.

Si dans ces conditions, des traces d'acide sulfureux pas-
sent à la distillation, l'eau iodée le transforme en acide sulfuri-
que et il ne reste plus qu'à ajouter à la dilution du distillat,
quelques gouttes de chlorure de Baryum qui par l'apparition
d'un précipité blanc de Sulfate de Baryum, manifeste la pré-
sence d'acide sulfureux dans le distillat.

Pour éviter toute cause d'erreur pouvant provenir de
l'entraînement possible d'hydrogène sulfuré, et son action ul-
térieure sur l'eau iodée, la même opération a été effectuée sur
des milieux ayant réagi positivement, c'est à dire avec dépôt
complètement noir. Aucun passage n'a pu être démontré dans
ce cas.

(1) Après différents essais, je me suis arrêté à la méthode par dis-
tillation pour la recherche de SO^2 .

RÉSULTATS.

Une espèce dans un bouillon renfermant du Sulfate de Sodium a donné un très léger précipité après 24 heures d'ensemencement; la réaction reste négative les jours suivants.

Une autre, toujours sur milieu au Sulfate de Sodium, après une réaction très légèrement positive après 24 heures, devient négative le 3ème et le 4ème jour et très légèrement positive de nouveau le 5ème jour.

D'autres expériences avec Sulfate de Potassium, puis avec Sulfonal, exécutées dans les mêmes conditions, et toujours avec des Espèces normalement négatives, ne permirent pas d'obtenir les résultats espérés.

Il s'ensuit qu'il ne nous a pas été possible de mettre nettement en évidence l'acide sulfureux qui pourrait se former dans les cultures à réaction au plomb négatives, et renfermant des composés à groupement SO^2 ou SO^3 .

Il est nécessaire de tenir compte, que, quand la réaction est négative et si l'on admet que cette négativité tient à la réaction indiquée entre H^2S et SO^2 , la quantité de SO^2 formée est vraisemblablement très faible et toujours en rapport, naturellement avec la quantité de Soufre initialement contenue dans le milieu et transformée ensuite par la Bactérie.

Si l'on estime, d'autre part, que cet acide sulfureux peut être réduit au fur et à mesure de son apparition, par l'hydrogène sulfuré mis en liberté lui aussi dans le milieu, il est certain que la quantité restant libre, doit être très faible et probablement insuffisante pour pouvoir être décelée ensuite par distillation.

Il faut tenir compte aussi des conditions de la vitalité de la culture, de la vitesse du développement et du volume total du bouillon ensemencé, sans oublier la teneur en Soufre de la préparation.

A ce point de vue, on ne peut nier non plus l'influence dans la réaction, des combinaisons, (acides aminés, molécules plus ou moins dissociées) dans lesquelles se trouve engagé le Soufre sous une forme oxydée et d'où la simple ébullition ne parvient pas toujours à le dégager pour l'obtenir sous la forme SO^2 .

Il m'a semblé qu'il fallait abandonner cette manière de voir, et orienter les recherches dans une autre voie pour tenter d'apporter une explication, si faible soit-elle, à la diversité des résultats obtenus.

2) HYPOTHÈSE DE L'INFLUENCE DE COMPOSÉS OXYDO-RÉDUCTEURS

Si l'on tient compte des travaux actuellement publiés sur les phénomènes d'Oxydo-réduction, on doit se demander à propos de la réaction du Colibacille vis à vis des milieux au plomb, si les complexes renfermant du Soufre, ne sont pas soumis, suivant des conditions à déterminer, à des réactions de ce genre.

De nombreux auteurs, en effet, ont étudié le pouvoir réducteur de certains éléments.

DE REY PAILHADE, en 1888, établit que les cellules de levure de bière ont le pouvoir de transformer le Soufre en Hydrogène sulfuré et montra que l'on retrouve cette propriété dans un certain nombre de tissus vivants.

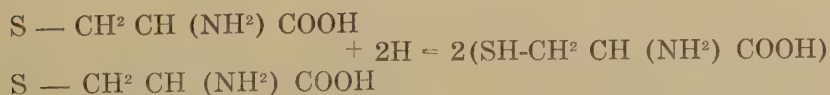
R. FABRE (1) écrit «qu'à côté des processus d'oxydation du genre de ceux auxquels président les polyphénol-oxydases et où l'Oxygène de l'air joue un rôle essentiel, il en existe toute une catégorie de nature également diastasique, qui se poursuivent à l'abri de l'Oxygène de l'air. Dans ce cas, la réaction, d'oxydation est nécessairement couplée à une réaction de réduction, l'Oxygène et l'Hydrogène étant empruntés à l'eau du milieu où on opère.

« Des molécules d'espèces chimiques différentes sont susceptibles de jouer les unes, le rôle d'accepteur d'Oxygène, et les autres celui d'accepteur d'Hydrogène».

C'est la définition en quelques lignes des phénomènes d'Oxydo-réduction.

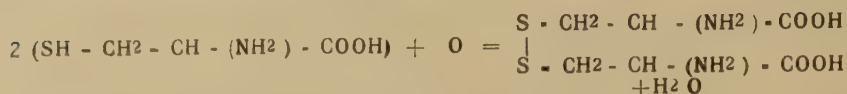
On conçoit facilement, que l'attention des physiologistes ait été attirée vers ces réactions et que l'on ait multiplié les recherches sur la question. Ils sont nombreux en effet, les travaux qui ont eu pour but, soit d'étudier la réaction dans ses effets, et dans les produits nouveaux qui se forment, soit d'isoler les substances qui possèdent la propriété de fournir le phénomène oxydo-réducteur.

On a reconnu qu'un système oxydo-réducteur très important est constitué par le couple Cystine-Cystéine. La Cystine est un produit que l'on rencontre toujours dans l'hydrolyse des protides. Elles se réduit facilement pour donner la Cystéine d'après la réaction :



(1) R. FABRE — LE GLUTATHION - J. de Ph. & Chimie, 1er & 16 Mars 1927.

Par contre, la Cystéine est extrêmement oxydable et se transforme très vite en Cystine -



Cette oxydation se fait, non seulement en présence d'air ou d'Oxygène, mais sous l'influence de composés très divers. La forme oxydée constitue le disulfure et la forme réduite est un sulfhydryle.

HOPKINS (1) en 1921 isole une substance qu'il avait rencontrée dans la levure de bière, dans le muscle, dans le foie des mammifères et dans divers tissus animaux, qu'il désigna sous le nom de « Glutathion ».

Pour l'obtenir, il s'était inspiré des travaux de DE REY PAILHADE (2) et avait choisi la levure de bière comme matière première. Après des manipulations assez longues, il réussit à mettre en liberté dans certains cas, le Glutathion réduit, dans d'autres, le Glutathion oxydé. Cette dernière forme est la plus stable.

Elle se présente sous l'aspect d'une poudre blanche hygroscopique, fondant en se décomposant vers 183° C. Très soluble dans l'eau, elle est insoluble dans la plupart des dissolvants organiques.

(1) HOPKINS, Biochem. Journal XV - p. 286, 1921.

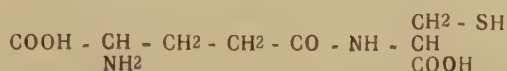
» » » XIX - p. 787 1925

(2) DE REY PAILHADE - C. R. Ac. des Sciences CVI 1888 p. 1683
C. R. Soc. Biologie, 3 avril 1897 — Sur les ferments oxydants, Note sur l'existence simultanée dans les tissus animaux de philothion et de l'oxydase chargée de les oxyder.

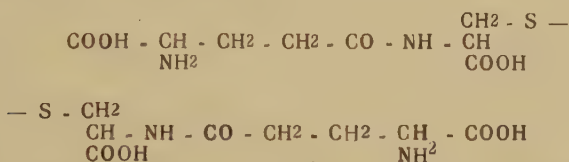
C. R. soc. Biologie 26 MARS 1898 — Démonstration du pouvoir réducteur des tissus au moyen des tissus desséchés.

Elle s'hydrolyse facilement par les acides, mais sa protéolyse, sous l'action des ferments des tissus, n'a pu être réalisée.

C'est un dipeptide formé de l'union d'une molécule d'acide glutamique et d'une molécule de Cystéine, L'hydrolyse en ses éléments a fait attribuer au Glutathion réduit, la formule suivante :



La molécule possède un groupe SH. pouvant devenir par oxydation un disulfure. La réaction est calquée sur celle de l'oxydation de la Cystéine, et on obtient le Glutathion oxydé :



de sorte que l'on peut avoir à faire tantôt à une diglutamyl-cystéine, tantôt à une diglutamyl-cystine, corps facilement solubles dans les humeurs de l'organisme, constituant par ailleurs un système oxydo - réducteur très répandu dans la nature.

BLANCHETIERE (1) et ses collaborateurs ont pu déterminer chez le chien, les quantités de Glutathion contenues dans divers organes. Les chiffres reproduits ci-dessous expriment des milligrammes de Glutathion réduit pour 100 grammes de tissu.

(1) BLANCHETIERE & BINET - C. R. Soc. de Biologie XCIV 1926
p. 494 XCV —1926—P.558—p. 621 — p. 1098.

Teneur en milligr pour 100 g. de Tissus (Chien)

Chiffres extrêmes trouvés :

Foie	74	87
Poumon	74	87
Rate	193	215
Rein	264	306
Cœur	103	136
Pancréas	201	234
Ovaire	143	324
Testicules	255	266
Surrénale	374	585
Thyroïde	143	293
Muscle droit	58	
Muscles adducteurs	67	81

Les auteurs insistent sur la teneur élevée de la glande surrénale et font observer qu'il y a probablement là, une relation avec le rôle que la glande joue dans le Métabolisme du Soufre.

STEWART ET TUNNICLIFFE (1) avaient réalisé, en 1923, la synthèse du Glutathion oxydé et ont ainsi confirmé la constitution de la molécule.

Il est à remarquer que le Glutathion se transforme, sous l'influence des divers réactifs beaucoup plus facilement que le système Cystine-Cystéine — On le trouve généralement sous la

(1) C. P. STEWART et H. E. TUNNICLIFFE - Synthèse du Glutathion Biochim. Journal 19. 207 - 1925.

forme réduite dans les tissus, et son groupement sulfuré manifeste nettement un pouvoir réducteur; il s'ensuit que la transformation en la forme oxydée est très facile.

Il réduit rapidement le bleu de méthylène qu'il transforme en leucobase correspondante, en sorte que le groupe thiol de la molécule du Glutathion réduit, apparait comme un véritable intermédiaire, transporteur d'Hydrogène.

Le système réducteur peut fonctionner comme un régulateur des processus de réduction. Le mécanisme le plus simple qu'on puisse imaginer pour permettre aux réductions de s'effectuer est que, l'énergie est fournie par l'oxydation d'un corps empruntant précisément son Oxygène aux substances qu'il s'agit de réduire (1)

JACQUINOT (2) a provoqué la réduction du Bleu de Méthylène par du tissu hépatique et par le lait.

Il a pu mesurer l'influence qu'exerce sur la vitesse de la réduction, l'addition de diverses substances étrangères, telles que : Antioxygènes, bases, acides, sels, eaux minérales, alcaloïdes, sérums.

Les antioxygènes et les acides retardent la réduction alors que les bases et les sérums l'accélèrent.

Par contre, on peut constater sous l'influence du Glutathion, l'oxydation de certains protides des tissus, en milieu neutre ou légèrement alcalin. Le protide ainsi oxydé, peut ensuite subir une réduction si l'on introduit dans le milieu du

(1) WURMSER - Oxydations et Réductions - 1930. Les Presses Universitaires de France - Paris.

(2) JACQUINOT — Contribution à l'étude de la réduction du Bleu de Méthylène par les tissus animaux et par le lait. Thèse. Doctorat en Phie NANCY 1923.

Glutathion réduit, et le protide réduit peut réabsorber de l'oxygène. On se trouve ainsi en présence d'oxydations et de réductions successives. Les formes réduites ou oxydées du système peuvent servir d'agents réducteurs ou oxydants.

La transformation reversible : Glutathion réduit $\rightleftharpoons$ Glutathion oxydé est extrêmement sensible aux moindres réactifs.

L'existence de ce système dans de nombreux tissus a permis d'apporter quelques éclaircissements dans certaines réactions encore inexpliquées.

En particulier, les expériences tentées dans le domaine bactériologique ont ouvert la voie à des recherches qui abouti à des résultats très intéressants.

WURMSER (1) a signalé que pour déterminer la présence du Glutathion dans les milieux de culture, on pouvait utiliser l'une des trois réactions suivantes :

1) Le dérivé sulfhydrylé chauffé en milieu alcalin avec l'hydrate de plomb donne un précipité de sulfure.

2) Le Nitroprussiate de soude, en présence d'Ammoniaque, donne avec le Glutathion, une coloration rouge violacée. La forme réduite du Glutathion donne seule cette réaction, mais, en présence de Cyanure, la forme disulfure est réduite, et la réaction au Nitroprussiate décèle, ainsi, la totalité du Glutathion.

3) La Cystéine et le Glutathion réduit donnent avec le Réactif de FOLIN et WU (Solution d'Acide Phosphotungstique) une coloration bleue, en milieu alcalin. WURMSER donne d'autre part, les résultats obtenus sur des milieux de culture de différents germes, avec le Réactif au Nitroprussiate.

(1) WURMSER — Loco citato.

Résultat positif	Résultat négatif
<i>Bacillus Welchi</i>	<i>Staphylocoque</i>
» <i>Tetani</i>	<i>streptocoque</i>
» <i>Paratyphosus B</i>	<i>pneumocoque</i>
» <i>typhosus</i>	<i>gonocoque</i>
» <i>pyocyaneus</i>	<i>meningocoque</i>
» <i>coli</i>	<i>sarcina aurantiaca</i>
» <i>proteus</i>	<i>Bacillus influenzae</i>
» <i>alcaligenes</i>	<i>Bac. de Morax</i>
» <i>fluorescens</i>	<i>Bac. dysentericus de Flexner</i>
<i>Vibrio septicus</i>	» » <i>Y</i>
<i>Vibrio cholerae</i>	» » <i>Schiga</i>
	» » <i>Coli</i>
	» » <i>Sporogenes</i>
	<i>Bacille de la phléole</i>

C'est la confirmation des travaux de MAC LEOD et GORDON en 1924 (1) de CALLOW et ROBINSON en 1925 (2).

LASSEUR et ses collaborateurs en opérant sur le Bleu de Méthylène, le Bleu de Crésyle, la Thionine, ont réussi à réduire ces différents composés, au moyen de corps microbiens rigoureusement débarrassés de toute trace de substance nutritive, par des lavages répétés à l'eau distillée, et provenant d'espèces bactériennes différentes.

MARCHAL (3) a effectué la recherche des dérivés sulphydrylés sur certaines souches de *B. pyocyaneus* et de *B. prodigiosus*, issues d'une seule plastide, qu'il ensemence en eau peptonée.

La mise en évidence de la présence du Glutathion dans les cultures est assurée par la recherche de la Cystéine à l'aide du Réactif Phosphotungstique de FOLIN & WU.

Cette réaction est complétée par des épreuves au Nitroprussiate de soude. Bref, l'existence des deux formes du Glutathion : forme réduite et forme oxydée a pu être reconnue dans les milieux où s'étaient développées les 8 souches de *B. pyocyaneus*, mises à l'étude et les 2 souches de *B. prodigiosus*.

(1) MAC LEOD ET GORDON — Production de peroxydes pour le Pneumococque et autres bactéries — Journal Path. and Bact. 25-139-1924
MAC LEOD ET GORDON Production de composés organiques soufrés et particulièrement du Glutathion dans les cultures bactériologiques. — Biochem. Journal 18-937-1924.

(2) CALLOW ET ROBINSON - La réaction au nitroprussiate chez les Bactéries Biochem. Journal 19-9-1925.

(3) MARCHAL - Catalyseurs sulfurés-Etude du Glutathion. Sa recherche chez quelques Bactéries - Fas II - Bulletin de l'Association des Diplômés de microbiologie de la Fac. de Phie de NANCY - JUIN 1931.

Le Colibacille a fait l'objet de recherches toutes spéciales. Il est signalé dans le Tableau de WURMSER reproduit à la page 91 comme donnant une réaction positive dans la recherche du Glutathion.

COOK (1) a signalé les phénomènes de réduction qu'il a obtenus au moyen de cultures de Colibacilles en présence d'Oxygène et de Bleu de méthylène.

De même COOK, HALDANE et MAPSON (2) ont pu par le développement du Colibacille dans certaines conditions, oxyder et transformer complètement certains produits chimiques, tels que le glucose et certains dérivés succiniques (3)

Etablissant une relation entre la présence du Glutathion dans les cultures bactériologiques, et les résultats obtenus dans mes expériences sur les diverses Souches de Colibacille, dans les milieux additionnés de composés à base de Soufre, il me parut intéressant de faire la recherche de la Cystéine, suivant la technique signalée précédemment, dans quelques cultures.

Dans ce but, j'ai utilisé le bouillon peptoné ordinaire qui a été réparti dans des tubes et stérilisé.

(1) COOK. Réduction produite par le Colibacille en présence d'oxygène et de Bleu de Méthylène. Biochem. Journal. T. 24, 1930.

(2) COOK, HALDANE ET MAPSON Relation entre les catalyseurs respiratoires. Biochem. Journal. t. 25. 1931.

(3) COOK et HALDANE - Respiration du coli, Biochem. Journ. t. 25 — 1931.

Un certain nombre de ces tubes sontensemencés par des Souches de Colibacille, les autres ne le sont pas.

Le tout est mis à l'étuve à 37° C.

La réaction à l'Acide phosphotungstique a été tentée dès le 5e jour de séjour à l'étuve, à la fois sur les tubes ensemencés et sur les tubes non ensemencés, ces derniers devant servir de témoins.

La réaction s'est montrée positive pour 2 souches sur 3, cette dernière ne donne qu'une très légère coloration. Les tubes témoins sont restés négatifs.

Je n'ai pas cru devoir faire des recherches sur un plus grand nombre d'espèces. MARCHAL ayant signalé, d'autre part, que le Glutathion paraît être un produit constant du métabolisme bactérien, il semble bien, que l'on puisse admettre d'une façon certaine, qu'il existe dans les cultures de Colibacille un Système Oxydo-Réducteur qui doit jouer un rôle de catalyseur actif et qui peut favoriser ou au contraire empêcher la coloration noire à propos des milieux au plomb.

Revenant à ce milieu et attribuant au Système Glutathion une certaine importance vis-à-vis de la formation du Sulfure de plomb, j'ai pensé obtenir un meilleur résultat en ajoutant aux milieux, de la Cystine, élément qui d'après ce que nous venons de voir, devait certainement favoriser la réaction dans une certaine mesure.

J'ai donc préparé une nouvelle série de tubes de gélose au plomb comme précédemment, mais en ajoutant dans chaque tube 0,05 de Cystine.

Les tubes sont ensuite placés dans les mêmes conditions que précédemment et examinés tous les jours.



TABLEAU XXI

DURÉE DE SEJOUR A L'ETUVE
HEURES

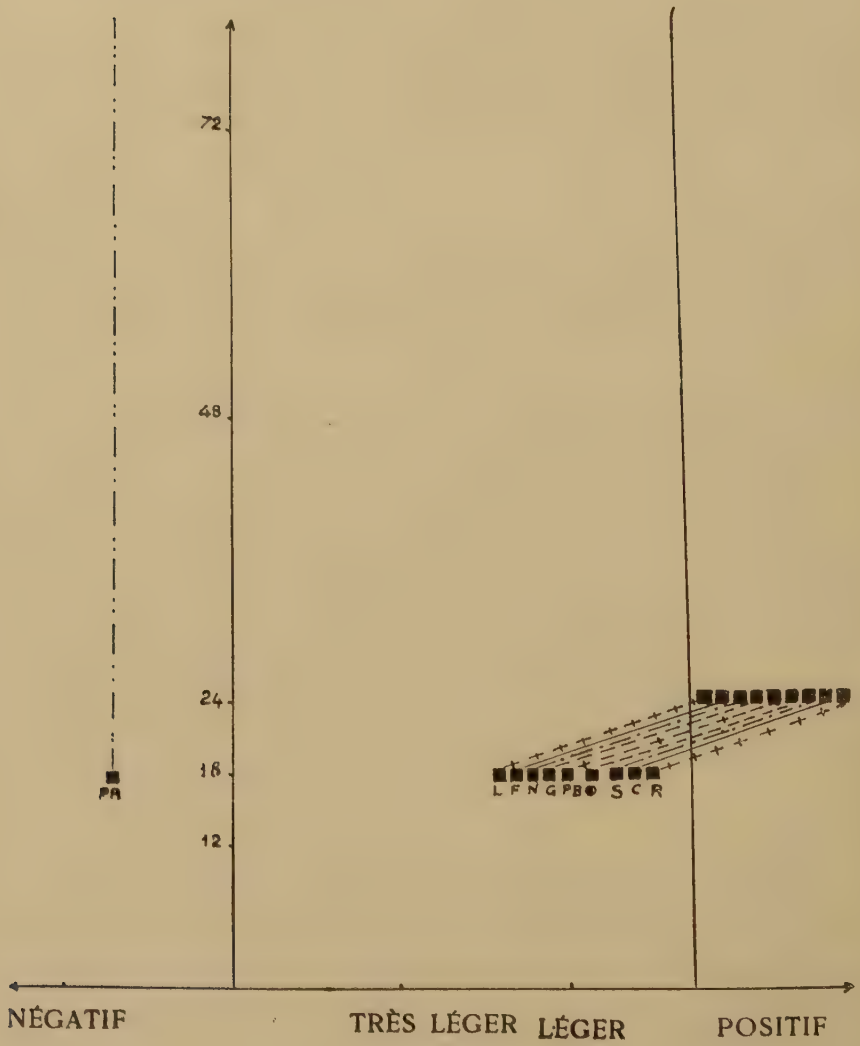


TABLEAU XXI

Avec la Cystine, les résultats sont positifs pour tous les tubes très rapidement, sauf toutefois pour le Paratyphique A qui donne une réaction négative.

Les milieux noircissent très rapidement et à partir de la 18e heure.

Le Paratyphique B noircit également les milieux très nettement, alors que le Paratyphique A reste négatif aussi bien dans l'Eau de fontaine que dans l'Eau distillée.

Cette expérience répétée plusieurs fois a toujours donné le même résultat.

TABLEAU XXII

Comme expérience de contrôle, si l'on emploie un milieu préparé avec de l'Eau de fontaine débarrassée de ses Sels alcalino-terreux par l'Oxalate de Sodium comme il a été dit page 79 et que l'on ajoute de la Cystine, les diverses Souches de Colibacille et le Paratyphique B donnent toujours un résultat positif, très rapidement. Quant au Paratyphique A il devient légèrement positif.

Il semble donc que le bouillon gélosé contenant de la Cystine dans la proportion de 0.05 par tube, pourrait être un milieu de différenciation très commode pour séparer le Paratyphique A des diverses Souches de Colibacille et du Paratyphique B dans les conditions ordinaires de la Méthode à la gélose au plomb.

MILIEUX SYNTHÉTIQUES.

Nous venons de voir que l'addition de Cystine paraît faciliter sérieusement la positivité de la réaction au plomb, pour les Colibacilles, ensemencés dans le bouillon peptoné classique gélosé ou non.

Pour compléter ces expériences, j'ai préparé des bouillons synthétiques renfermant du Soufre minéral, auxquels il a été ajouté de l'Asparagine et le Sel de plomb comme précédemment.

Les formules des milieux synthétiques utilisés sont les suivantes: (1)

1. — Sulfate ferreux	0.10
Chlorure de Calcium	0.40
Sulfate de magnésium	5
Phosphate acide de potassium ...	2.50
Glycérine	25
Asparagine	9
Eau distillée	1000
2. — Sulfate ferreux	0.10
Chlorure de Calcium	0.40
Phosphate acide de potassium ...	2.50
Glycérine	25
Asparagine	9
Eau distillée	1000
3. — Sulfate ferreux	0.10
Chlorure de calcium	0.40
Phosphate acide de potassium ...	2.50
Urée	10

(1) Certaines de ces formules m'ont été fournies très aimablement par M. le Professeur Lasseur et je lui en exprime toute ma reconnaissance. Spillmann a employé le premier de ces milieux pour étudier le pouvoir indologène du Colibacille. *Bulletin de l'Ass. des dip. de Microbiologie de la F. de Ph. Nancy*, n. 2, p. 35.

	Glycérine	25
	Asparagine	9
	Eau distillée	1000
4. —	Sulfate ferreux	0.10
	Chlorure de Calcium	0.40
	Phosphate acide de potassium ...	2.50
	Sulfate de magnésie	5
	Succinate d'ammoniaque	1
	Glucose	10
	Glycérine	20
	Eau distillée	1000
	Asparagine	9
5. —	Sulfate ferreux	0.10
	Chlorure de Calcium	0.40
	Phosphate acide de potassium ...	2.50
	Asparagine	9
	Urée	10
	Sulfite acide de sodium	5
	Eau distillée	1000
6. —	Sulfate ferreux	0.10
	Chlorure de Calcium	0.40
	Phosphate acide de potassium ...	2.50
	Asparagine	9
	Urée	10
	Trional	5
	Eau distillée	1000
7. —	Sulfate ferreux	0.10
	Chlorure de Calcium	0.40
	Phosphate acide de potassium ...	2.50
	Asparagine	
	Urée	10
	Soufre lavé	5
	Eau distillée	1000

Une série de ces divers milieux a été ensemencée telle quelle.

Une autre série a été additionnée de Cystine à raison de 0.05 par tube, puis ensemencée de la même façon. ...

Les diverses Souches de Colibacille se sont développées normalement, mais alors que d'une façon générale, la première série reste négative vis à vis du plomb avec la plupart des Espèces envisagées, les milieux à la Cystine au contraire, ont toujours donné des résultats positifs plus ou moins accusés.

La Cystine ajoutée aux milieux préparés pour la réaction au plomb paraît donc être le produit de choix pour obtenir des réactions positives par formation de sulfure de plomb avec le genre Colibacille.

Il semble qu'il y aurait intérêt à admettre comme formule générale le milieu peptoné classique gélosé au plomb additionné de Cystine.

Les divers Colibacilles mis en culture ainsi que le Paratyphique B comme il a été signalé page 97 ont tous donné une réaction positive alors qu'au contraire le Paratyphique A est resté négatif.

Il faudra encore sans doute un certain nombre d'expériences sur des Espèces d'origine différente, pour admettre d'une façon définitive cette méthode de séparation des Colibacilles et du Paratyphique A qui cependant, d'ores et déjà, paraît très intéressante à signaler.

CONCLUSIONS.

De l'ensemble des expériences auxquelles je me suis livré en vue d'étudier tout spécialement l'action de quelques Races de Colibacille sur les milieux renfermant un sel de plomb, on peut conclure ce qui suit :

1° — Les milieux de formule classique renferment toujours du Soufre sous deux états chimiques différents : Soufre minéral, Soufre organique.

2° — L'évolution des Espèces envisagées agit directement sur les éléments renfermant du Soufre. Cette action a pour résultat d'augmenter la quantité de Soufre libre dans le milieu, dosable par les méthodes d'analyse habituelle.

3° — En ne considérant que les éléments à constitution minérale, la réaction au plomb est nettement favorisée par l'addition au milieu, soit de fleur de Soufre, soit d'Hyposulfite de sodium.

4° — Elle est nettement retardée et quelquefois supprimée si l'on emploie des composés renfermant le groupement SO^2 , c'est-à-dire les Sulfites neutre ou acide.

5° — Les composés à groupement SO^3 (Sulfate) nuisibles

dans les milieux à l'eau distillée donnent avec les milieux à l'eau de fontaine, des résultats sensiblement comparables aux tubes témoins.

6° — Cette différence d'action entre les milieux à l'eau de fontaine et les milieux à l'eau distillée, ayant été constatée, un essai d'addition à l'eau distillée de chlorure de calcium et de chlorure de magnésium ne m'a pas fourni l'explication qu'on pouvait espérer.

L'eau de fontaine de Reims est normalement javellisée à la dose de un décimilligramme de chlore libre par litre.

Cette opération apporte-t-elle à l'eau en question, des modifications suffisamment importantes dans la disposition des molécules minérales, pour que la composition du milieu en soit troublée au point de donner, dans certains cas, des résultats très différents de ceux obtenus avec les bouillons préparés à l'eau distillée ?

Il faut reconnaître d'autre part, que les milieux à l'eau de fontaine sont plus riches en Soufre minéral, que les milieux à l'eau distillée.

7° — L'addition d'Oxalate de Sodium à l'eau de fontaine, dans le but de précipiter les sels alcalino-terreux, paraît favoriser la réaction.

8° — Si l'on ajoute aux divers milieux utilisés, des composés Soufrés de constitution organique, du groupe Sulfonal, on remarque que ces derniers ont toujours accusé des résultats généralement négatifs.

9° — L'addition d'Asparagine en milieu synthétique ne paraît pas apporter d'amélioration à la réaction, du moins pour les espèces considérées.

10° — Du fait que les composés minéraux à groupement SO^2 & SO^3 et les composés organiques du groupe Sulfonal ne favorisent pas la réaction, il y a lieu de se demander si le Micro-organisme, en dissociant les molécules soufrées, ne met pas en liberté une certaine quantité d'Acide Sulfureux qui, par réaction sur l'Hydrogène sulfuré produit en même temps, empêcherait l'apparition du Sulfure de plomb.

Les essais effectués en vue de mettre en évidence l'existence de l'Acide sulfureux dans les milieux, sont cependant restés négatifs.

11° — La connaissance que nous avons actuellement des phénomènes d'Oxydo-réduction, permettra, sans doute, de comprendre par une analyse très complète du milieu (1) pourquoi certaines des espèces bactériennes qui nous occupent, restent négatives vis à vis du réactif métallique, alors que d'autres au contraire, dans les conditions normales de la réaction, sont positives.

La présence des dérivés sulfhydrylés ayant été reconnue

(1) On peut consulter avec fruit à ce sujet la 2° Edition du Livre qui vient d'être publié par Michaelis chez Julius Springer, à Berlin, 1933, intitulé : Oxydations. Réductions Posen. 259 pages.

dans les cultures, on pourra admettre avec **WURMSER** (1) que ces composés suivant leur état d'oxydation, peuvent favoriser ou au contraire retarder ou empêcher les réactions de ce genre.

12° — Tenant compte de l'apparition de ces dérivés à la suite de l'évolution bactérienne, et estimant que la quantité mise en liberté dans le milieu peut varier en fonction de diverses conditions et par là influencer notablement le résultat final de la réaction, j'ai ajouté intentionnellement de la Cystine dans les milieux en expérience. Les résultats, pour les diverses espèces de Colibacille ont été positifs.

Les essais en milieux synthétiques ont confirmé le phénomène.

13° — Il a été constaté préalablement que si l'on veut favoriser l'apparition de la coloration noire dans la réaction au plomb, et par suite la généraliser pour le genre Colibacille il est absolument nécessaire d'ajouter au milieu de culture, des éléments renfermant du Soufre aussi peu oxygénés que possible.

La fixation d'Hydrogène par le Colibacille sur ces éléments paraît suffisamment démontrée, mais doit être limitée à un certain nombre de corps. Elle s'accommode très bien de la présence dans les milieux, soit de Soufre métalloïde, soit d'Hyposulfite de Sodium.

Le rendement maximum a été obtenu avec la Cystine.

(1) MARCHAL-loco citato - Fasc. II du Bulletin de l'Association des diplômés de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy.

14° — La Cystine paraît être l'élément de choix pour obtenir la réussite de la réaction.

Au surplus, la Cystine a pu permettre, en utilisant les milieux envisagés et pour les espèces considérées, la différenciation du genre Colibacille d'avec le Paratyphique A.

Il restera sans doute à faire encore de nombreuses expériences sur diverses Souches, pour permettre l'application régulière de la méthode au plomb ainsi améliorée.

Cependant les résultats obtenus sont déjà très encourageants.



BIBLIOGRAPHIE

- C. H. ANDREWES et W. J. ELFORD. — Le bactériophage « meurtrier » des bactéries, *British Journal Experimental Pathology*, t. 13, fév. 1932.
- I. ANGELO. — Sensibilité comparée de 32 souches de Coli urinaire à la sérothérapie et au bactériophage spécifique, *Bull. Acad. Méd. Paris*, t. 104, 23 déc. 1930.
- F. ARA. — Effet des teintures sur le développement du Coli, *Bolletino della Societa Italiana di Biologia Sperimentale*, t. 6, mai 1931.
- F. ARA. — Effets des sels de bismuth sur le développement du Coli, *Ibidem*, t. 6, mai 1931.
- F. ARLOING et A. DUFOUR. — Autopurification de l'eau de rivière, *Comptes rendus Société de Biologie*, t. 106, 30 janv. et 6 fév. 1931.
- F. ARLOING et A. DUFOUR. — Le Coli dans l'eau du Rhône; élimination spontanée, *Annales d'Hygiène*, t. 9, juin 1931.
- F. ARLOING, A. DUFOUR et P. ETIENNE-MARTIN. — Action d'une concentration de ions d'hydrogène pour l'autopurification de l'eau fluviale, *Comptes-rendus Société de Biologie*, t. 107, 18 mai 1931.
- L. BARGI. — Infection au Coli; symptomatologie, diagnostic et thérapeutique. Revue de la littérature, *Rassegna Di Terapia E Patologia Clinica*, t. 4, août 1932.
- BARTH. — Examen de l'eau potable quant au colibacille. *Zentralblatt für Bakteriologie*, t. 115, 20 fév. 1930.
- A. BECK. — Variante du Coli semblable au bac. de la paratyphoïde A dans l'urine de l'enfant, *Zentralblatt F. Bakteriologie* (Abt. I); t. 122, 30 oct. 1931.
- BERGER (D). — Biologie du Coli, *Médecyna Doswiadczalna i Spoieczana*, t. 12, 1930.
- BESSON et EHRINGER. — Infections intestinales et Colibacille. *Revue médic.* 1924, p. 345.
- B. I. BLANKOFF et T. L. GRINGOT. — Fermentations diverses du groupe Coli-Typhoïde, *Microbiologhitcheski Journal*, t. 9, 1929.
- BOYER et BOIRON. — Variation avec la durée de son séjour dans l'eau de la sensibilité du Colibacille aux hypochlorites, *C. R. Sté de Biologie*, t. 108, 1er déc. 1931.

- BRAUN et MUNDEL. — Besoins nutritifs des Bacilles de la Diphtérie dans les milieux synthétiques, *Zentralblatt für Bactériologie*, t. 112, 1929.
- J. CHARVAT. — La colibacillose, *Gasopis Lekaruu Geskych*, t. 70, 27 nov. 1931 et 4 déc. 1931.
- CALLOW et ROBINSON. — La réaction au Nitroprussiate chez les Bactéries, *Biochem-Journal*, 19, 19, 1925.
- R. P. COCK. — Réduction produite par le BC commun en présence d'oxygène et de bleu de méthylène, *Biochemical Journal*, t. 24, 1930.
- R. P. COCK et R. S. ALCOCK. — Effet de la concentration en ions d'hydrogène sur les oxydations par le Coli, *Biochemical Journal*, t. 25, 1931.
- R. P. COOK, H. B. HALDANE et L. W. MAPSON, — Relation entre les catalyseurs respiratoires, *Biochemical Journal*, t. 25, 1931.
- R. P. COOK et J. B. HALDANE. — La respiration du Coli, *Ibidem*, t. 25, 1931.
- F. DIENERT et P. ETRILLARD. — Réactions pour le Coli dans l'eau, *Annales Institut Pasteur*, t. 46, mars 1931.
- DOPTER et SACQUEPEE. — Précis de Bactériologie, 1914.
- A. R. ELFVING. — Effet de divers antiseptiques sur la croissance des bacilles du colon dans l'urine; expériences in vivo, *Acta Societatis Medicæ Fennicæ Duodecim* (Ser. A.) art. 12) t. 15, 1932.
- EIJKMANN. — L'épreuve de fermentation à 45 ° comme méthode adjuvante dans l'analyse des eaux potables, *Zentralbl. f. Bakt.*, I orig. t. XXXVII, p. 742, 1904.
- R. FABRE. — Le Glutathion, *Journal de Pharmacie et de Chimie*, 1er et 16 mars 1927.
- FABRE et SIMONNET. — Contribution à l'étude physiologique du glutathion par la méthode de perfusion, *Journal de Ph. et Chimie*, 1er mai 1928.
- FABRE. — Etude des systèmes d'oxydation-réduction. Importance des phénomènes d'oxydation-réduction en Biologie. Détermination du r H cellulaire, *Journal de Ph. et de Ch.*, 1er juin 1929.
- FABRE et SIMONNET. — Recherches sur le pouvoir oxydo-réducteur des tissus, *Journal de Ph. et de Ch.*, 1er août, 1er septembre et 16 septembre 1930.

- FABRE et SIMONNET. — Contribution à l'étude des phénomènes d'oxydo-réduction. Recherches sur la levure de la bière. *Journal de Ph. et de Ch.*, 16 nov. et 1er déc. 1931.
- M. FAGUET. — Multiplication des Coli, *Comptes rendus Acad. des Sciences*, t. 194, 14 mars 1932.
- J. FISCH. — Les bactéries du colon; conditions favorisant le développement des infections, *Journal d'Urologie*, t. 32, Juill. 1931.
- J. FISCH. — Des pseudostreptocoques, variation morphologique du Coli, *Journal d'Urologie*, t. 31, avril 1931.
- G. FISCHER. — Développement normal et culture de transmigration, *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinaviae*, Suppl. t. 9, 1932.
- FLEURY. — Thèse Faculté de Médecine et de Pharmacie de Bordeaux. Recherches expérimentales sur le Colibacille marin, 1931.
- I. GHORGHU et C. BARTH. — Propriétés biochimiques et sérologiques des différentes souches, *C. R. Soc. Biol.*, t. 98, 1er juin 1928,
- GOIFFON. — Les Colibacilloses, chez Masson et Cie, 1931.
- GORRIERI. — Différenciation entre groupes. *Società Internazionale di Microbiologia, Bollett. D. Sezionne Ital.* t. 4, juillet, août 1932.
- GRIMBERT. — Diagnostic des Bactéries par leurs fonctions biochimiques, Paris, 1903.
- W. HAUSAM. — Cycle vital du Coli, *Zentralblatt. F. Bakteriologie* (Abt., 2), t. 82, 20 novembre 1930.
- L. F. HEWITT. — Effet du bactériophage sur les potentiels oxydation-réduction des cultures de Coli, *Biochem. Journal* t. 25, 1931.
- HOPKINS. — Sur le Glutathion, *Biochem. Journal*, t. XV 1921, t. XIX 1925.
- HOPKINS et DIXON. — Sur le Glutathion, *Journal Biol. chem.* t. LIV 1922.
- HUGOUNENCQ et DOYON. — Sur une nouvelle fonction chimique commune au Colibacille et au Bacille d'Eberth, *C. R. Soc. de Biologie*, 1897, p. 198.
- JACQUINOT. — Contribution à l'étude de la réduction du Bleu de Méthylène par les tissus animaux et par le Lait. Thèse Doctorat en Pharmacie, Nancy, 1933.
- K. VON KAGEDES. — Le Coli dans l'eau, *Gesundheits-Ingenieur*, t. 54.
- E. KLIENEBERGER. — Formation de formes atypiques sous l'influence du bactériophage, *Zentralb. F. Bakteriolog.*, t. 112, 19 juin 1929.

- M. KNOTH. — Différenciation des souches atypiques, *Zeitschrift für Fleisch- und Milchhygiene*, t. 41, 15 déc. 1930.
- M. LABBE, H. LABBE et F. NEPVEUX. — Techniques de Laboratoire appliquées aux Maladies de l'appareil digestif et de la nutrition, chez Masson et Cie, 1932.
- G. LAMBIN. — Méthodes de mesure de l'activité antimicrobienne des substances chimiques. *Thèse Doctorat ès Sciences*, Paris 1933.
- LASSEUR, MARCHAL et DUPAIX. — Modifications temporaires. Modifications durables observées chez les bactéries. Fasc. III *Bulletin de l'Association des Diplômés de microbiologie de la Fac. de Pharm. de Nancy*, 1932.
- F. A. LENTZE. — Action favorisant la croissance des bacilles de la diphtérie due à l'hydrogène sulfuré, *Zentralblatt f. Bakteriologie und Parasitenkunde*, t. 118, 1930.
- MAC LEOD et GORDON. — Production de composés organiques soufrés et particulièrement Glutathion dans les cultures bactériologiques, *Biochem. Journal*, 18, 937, 1924.
- MAC LEOD et GORDON. — Production de Peroxydes par le Pneumocoque et autres Bactéries, *Journal de Path. and Bact.*, 25, 139, 1924.
- MARCHAL. — Catalyseurs sulfurés. Etude du Glutathion, sa recherche chez quelques bactéries. Fasc. II *Bulletin de l'Ass. des Diplômés de Microbiologie de la Fac. de Pharm. de Nancy*, 1931.
- MARCHAL. — Variabilité en Microbiologie. Son Existence. Ses Modalités. Fasc. IV. *Bulletin de l'Ass. des Diplômés de Microbiologie de la Fac. de Pharmacie de Nancy*, 1932.
- MARCHAL. — Quelques faits nouveaux concernant la variation et la dissociation en Microbiologie. Fasc. VII. *Bulletin de l'Ass. des Diplômés de Microbiologie de la Fac. de Pharm. de Nancy*, 1933.
- MARCHAL. — Variation et Mutation en Bactériologie, chez Lefrançois, Paris.
- B. MATTAR. — Contribution à l'étude du Colibacille dans les eaux de boisson. *Thèse de Doctorat, Fac. de Pharm. de Nancy*, 1930.
- † E. MINKEWITSCH. — Examen de l'eau potable par rapport au Coli, *Zentralblatt f. Bakteriologie* (Abt. I), t. 124, 25 fév. 1932. (Commentaire d'un article de Barth).
- J. E. MINKEWITSCH et J. J. ROGOSIN. — Coagulation du lait utilisée comme indication de la présence du Coli dans l'eau, *Ibidem*, t. 124, 30 mars 1932.

- L. MULLER. — Un nouveau procédé de différenciation des microbes des types Coli et Typhique, *C. R. Soc. de Biologie*, t. 87, 1922, p. 984 et 1251.
- A. NEVOT. — Le Coli dans le lait; nécessité du contrôle hygiénique dans l'approvisionnement en lait de Paris, *La Pratique Méd. Franç.*, t. 13, mars (A-B) 1932.
- J. J. NOBLE. — La fièvre typhoïde avec infection coexistante du Coli, *Bristol Médico-Chirurgical Journal*, t. 47, 1930.
- C. NYBERG. — Changement dans la résistance chez le Coli par facteurs externes, *Acta Societatis Medicorum Fennicae Duodecim* (Ser. A, art. 17), t. 15, 1932.
- PALGEN. — Essai sur la Biologie de quelques Bactéries. *Thèse Fac. de Pharm. de Nancy*, 1925.
- PASTEUR, VALERY-RADOT. — Deux figures de Savant, M. Roux, *Revue des Deux Mondes*, 15 Déc. 1933.
- S. RAMSINE. — Dissociation de culture de bac. du groupe typhoïdique, *C. R. Soc. Biol.* t. 104, 18 juillet 1930.
- J. A. RYLE. — Histoire naturelle, pronostic et traitement des infections avec le Coli, *Cuy's Hospital Reports*, t. 82, oct. 1932.
- E. RYTI. — Etude de 320 souches, *Acta Societatis Medicorum Fennicae Duodecim* (Ser. A. fasc. 3, n. 6), t. 13, 1931.
- J. SEMDEL. — Le bacille du colon qui n'oxyde pas le lactose, *Medycyna Doswiadczalna I Spoleczna*, t. 14 et 15, 1932.
- F. SILBERSTEIN, F. RAPPOPORT et E. KOLMER. — Différenciation du Coli, *Zentralblatt f. Bakteriologie* (Abt. I), T. 124, 25 fév. 1932.
- F. SIMONETTI. — La valeur du rouge de méthyle comme indication différentielle entre le coli fécal et le coli saprophyte, *Giorn. Di Abbtteriologia e Immunologia*, t. 5, 1930.
- J. SPILLMANN. — Quelques considérations sur le Colibacille, son séjour dans l'eau et son pouvoir indologène. Fasc. II du *Bulletin de l'Ass. des Diplômés de Microbiologie de la Fac. de Pharm. de Nancy*, 1930.
- J. SPILLMANN. — Persistance du Colibacille dans des eaux de provenance diverse. Facteurs déterminant cette persistance. Fasc. V du *Bulletin de l'Ass. des Diplômés de Microbiologie de la Fac. de Pharmacie de Nancy*, 1932.

STEWART et TUNNICLIFFE. — Synthèse du Glutathion, *Biochem. Journal*, 19, 207, 1925.

E. TECHOUEYRES. — Contribution à l'étude des actions destructives exercées sur les bactéries en suspension dans l'eau par les doses faibles de chlore introduites sous agitation violente et par les procédés métalliques. *Thèse Doctorat ès Sciences Naturelles*, Paris 1929.

Mme VANDEBERG-LOMMEL. — Stabilité des modifications biochimiques et antigéniques obtenues artificiellement, *Arch. Intern. de Méd. Expér.*, t. 6, oct. 1931.

VINCENT. — Sur un nouveau procédé d'isolement du Bacille typhique dans l'eau, *C. R. Soc. de Biologie*, 1890.

J. W. DE WAAL. — Coli atypiques et examen de l'eau potable, *Nederlandsch Tijdschrift voor Hygiene, Microbiologie en Serologie*, t. 6, 1931.

WURMSER. — Oxydations et Réductions. *Les Presses Universitaires de France*, Paris, 1930.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	Page 5
CHAPITRE PREMIER - Caractères généraux du Colibacille.	" 7
CHAPITRE II - Recherche du Colibacille par les milieux de culture	" 9
CHAPITRE III - Considérations générales sur les milieux employés pour la recherche du Colibacille	" 22
CHAPITRE IV - Etude du Milieu	" 29
CHAPITRE V - Etude de la Réaction	" 36
CHAPITRE VI - Interprétation des résultats obtenus	" 80
CONCLUSIONS	" 103
BIBLIOGRAPHIE	" 108

Vu et bon à imprimer

NANCY, le 19 Juin 1934.

Le Doyen,

P. SEYOT

.....

Vu et permis d'imprimer

Nancy, le 19 Juin 1934.

Le Recteur de l'Académie de Nancy,
Président du conseil de l'Université

L. BRUNTZ

B.G.T.R.D.

2, Square Desnouettes, PARIS-XVe